

**Untersuchungen zur Bildung von
Cellobioselipiden (Ustilaginsäure) in
*Ustilago maydis***

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt

von
Katharina Anna Josephs
aus Neuss am Rhein

Marburg/Lahn 2004

Vom Fachbereich Biologie _____
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am _____
_____angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Michael Bölker _____
Zweitgutachter: PD Dr. Reinhard Fischer _____
Tag der mündlichen Prüfung am _____

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von März 1999 bis Dezember 2002 in Marburg am Fachbereich Biologie unter Leitung und Betreuung von Prof. Dr. Bölker durchgeführt.

Erklärung

ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel: „Ustilaginsäureproduktion in *Ustilago maydis*“ selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

(Ort/Datum)

(Unterschrift mit Vor- und Zuname)

Meinen Eltern gewidmet

Zusammenfassung

Ustilago maydis, der Erreger des Maisbeulenbrandes, produziert unter Stickstoffmangelbedingungen große Mengen des wasserunlöslichen Glykolipids Ustilaginsäure. Um die biologische Bedeutung dieser amphipathischen Substanz aufzuklären, wurde versucht Mutanten herzustellen, die nicht mehr in der Lage waren, Ustilaginsäure zu produzieren. Dazu wurden über einen biochemischen Ansatz vermutlich am Stoffwechsel der Ustilaginsäure beteiligte Enzyme isoliert.

Es konnte eine UDP-Glukose abhängige Glukosyltransferase teilweise gereinigt werden, die den Zucker auf die Hydroxyfettsäure (Ustilinsäure) überträgt. Aufgrund der sehr geringen Stabilität dieses membrangebundenen Enzyms konnte allerdings keine Proteinsequenzierung erfolgen, die eine Identifizierung des verantwortlichen Gens ermöglicht hätte.

Durch Amplifizierung von cDNA mit Hilfe von degenerierten Primern konnten weitere Kandidatengene isoliert werden, die für Glykosyltransferasen kodieren. Mit Hilfe dieses Ansatzes wurde eine Sterolglukosyltransferase (USGT) identifiziert. Deletionsmutanten dieser Sterolglukosyltransferase (*ugt1*) zeigten jedoch keine Verminderung der Ustilaginsäureproduktion. Doppel-Deletionsmutanten (*ugt1 +ugt2*) beider in *Ustilago maydis* gefundenen Sterolglukosyltransferasen zeigten ebenfalls keinen Einfluss auf die Ustilaginsäureproduktion.

In einem Mutageneseansatz konnten UV-Mutanten isoliert werden, die nicht mehr in der Lage waren, Ustilaginsäure zu produzieren. Hierzu wurde die hämolytische Aktivität von Glykolipiden genutzt. Die UV-Mutante *red1* konnte mit Hilfe einer autonom replizierenden *Ustilago maydis*-Genbank komplementiert werden, wobei der komplementierende Bereich Teile eines Retrotransposons enthält. Aufgrund der kopienabhängigen Komplementierung wird von einem indirekten Effekt des Retrotransposons auf die Ustilaginsäureproduktion ausgegangen.

Abkürzungen und Fachbegriffe

Abb.	Abbildung	PC	Phenol/Chloroform
Amp	Ampicillin	PCR	"polymerase chain reaction"
AS	Ammoniumsulfat	PD	"potato dextrose"
bp	Basenpaar(e)	PEG	Polyethylenglycol
C-terminal	carboxyterminal	PIPES	Piperazine N-N'-bis (2-Ethansulphonat)
Cbx	Carboxin	PRE	"pheromone response element"
CM	"complete medium"	RACE	"rapid amplification of cDNA ends"
cpm	"counts per minute"	rpm	Umdrehungen pro Minute
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid	RT	"reverse transcription" oder Raumtemperatur
DEAE	Diethylaminoethyl	SDS	Natriumdodecylsulfat
DMF	Dimethylformamid	TAE	Tris-Acetat + Na ₂ -EDTA
DMSO	Dimethylsulfoxid	TE	Tris-Cl + Na ₂ -EDTA
dpm	decays per minute	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylen-Diamin
DTT	Dithiothreitol	TLC	Dünnschichtchromatographie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	Tris	Trishydroxymethylamino-methan
Glc	Glucose	U	Unit (Enzymaktivitätseinheit)
H ₂ O _{bid.}	zweifach destilliertes Wasser	UA	Ustilaginsäure
Hyg	Hygromycin	UARS	" <i>U. maydis</i> autonomously replicating sequence"
kb	Kilobasenpaar	UDP	Uridindiphosphat
kDA	Kilo Dalton	UI	Ustilinsäure
Maldi-TOF	Matrix assisted Laser desorption/Ionisation-Time of Flight Mass-spectrometry	Ü/N	über Nacht
MEL	Mannosylerythritollipid	UV	ultraviolettes Licht
MOPS	3-(N-Morpholino)propan-sulphonat	wt	Wildtyp
N-terminal	aminoterminal		
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm		
ORF	"open reading frame"		
PAA	Polyacrylamid		
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese		

ZUSAMMENFASSUNG	I
ABKÜRZUNGEN UND FACHBEGRIFFE.....	II
1. EINLEITUNG	5
1.1 <i>USTILAGO MAYDIS</i> ALS MODELLORGANISMUS	5
1.2 DER LEBENSZYKLUS VON <i>U. MAYDIS</i>	6
1.3 DAS TETRAPOLARE KREUZUNGSSYSTEM VON <i>U. MAYDIS</i>	8
1.4 GLYKOLIPIDE IN <i>U. MAYDIS</i>	9
1.5 BIODETERGENTEN	14
1.6 GLYKOSYLTRANSFERASEN	18
1.7 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	21
2. ERGEBNISSE	22
2.1 ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER USTILAGINSÄURE	22
2.1.1 Reinigung der Ustilaginsäure	23
2.2 REINIGUNG EINER AN DER SYNTHESE DER USTILAGINSÄURE BETEILIGTEN GLUKOSYLTRANSFERASE	
27	
2.2.1 Herstellung von Ustilinsäure als Akzeptorlipid	28
2.2.2 Glukosyltransferasetest	29
2.2.3 Enzymreinigung	30
2.3 IDENTIFIZIERUNG VON GLUKOSYLTRANSFERASEN AUS <i>U. MAYDIS</i>	37
2.3.1 Isolierung von Glukosyltransferasen aus <i>U. maydis</i> mit Hilfe eines PCR-gestützten	
Ansatzes 37	
2.3.2 Isolierung einer Glukosyltransferase mit Hilfe einer 3'RACE	38
2.3.3 Klonierung und Sequenzierung des <i>ugt1</i> -Gens	39
2.3.4 Herstellung und Analyse <i>ugt1</i> -defizienter <i>Ustilago maydis</i> Stämme	41
2.4 ISOLIERUNG VON USTILAGINSÄURE-DEFIZIENTEN UV-MUTANTEN	45
2.4.1 Isolierung von Hämolyse-defizienten <i>U. maydis</i> -UV-Mutanten	46
2.4.2 Charakterisierung der Hämolyse-defizienten UV-Mutanten	47
2.4.2 Komplementation der UV-Mutante Red1	51
2.4.3 Analyse des Retrotransposons in <i>U. maydis</i>	58
3. DISKUSSION.....	63
3.1 USTILAGINSÄURE	64
3.1.1 Ustilaginsäureproduktion	64
3.1.2 Biologische Funktion der Ustilaginsäure	65
3.2 GLUKOSYLTRANSFERASE ALS SCHLÜSSELENZYM DER USTILAGINSÄURE-BIOSYNTHESE	65
3.2.1 Nachweis der Ustilinsäure-abhängigen Glukosyltransferase	66
3.2.2 Revers genetischer Ansatz zur Identifizierung der Ustilinsäure-abhängigen	
Glukosyltransferase	67
3.3 KLASSISCH GENETISCHER ANSATZ	70

3.3.1	Isolierung von Ustilaginsäure defizienten UV-Mutanten	70
3.3.2	Analyse der UV-Mutante Red1	72
3.3.3	Retrotransposons in <i>U. maydis</i>	72
3.3.4	In Ustilaginsäure defizienten Mutanten wird das <i>hobS</i> -homologe Retrotransposon exprimiert 73	
3.3.5	Regulation der Retrotransposons.....	74
3.4	Ausblick	76
4.	MATERIAL UND METHODEN.....	77
4.1	MATERIAL	77
4.1.1	Medien, Lösungen, Enzyme und Kits	77
4.1.2	Oligonukleotide	84
4.1.3	Stämme	85
4.1.4	Plasmide, Genbanken und Plasmidkonstruktionen	86
4.2	MIKROBIOLOGISCHE, ZELLBIOLOGISCHE UND GENETISCHE METHODEN.....	90
4.2.1	<i>ESCHERICHIA COLI</i>	90
4.2.2	<i>Ustilago maydis</i>	91
4.3	MOLEKULARBIOLOGISCHE STANDARDMETHODEN	93
4.3.1	Isolierung von Nukleinsäuren	94
4.3.2	<i>in vitro</i> -Modifikationen von DNA	95
4.3.3	Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren.....	95
4.3.4	Sequenz- und Strukturanalyse.....	98
4.3.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	99
4.3.6	Identifizierung von cDNA mit Hilfe der Methode der „Rapid Amplification of cDNA Ends“ (RACE) 101	
4.4	BIOCHEMISCHE METHODEN	102
4.4.1	PROTEINREINIGUNG	102
4.4.2	Proteinreinigung	103
4.4.3	Glukosyltransferase-Assay.....	105
4.4.4	Reinigung und Nachweis der Ustilaginsäure.....	106
5.	LITERATURVERZEICHNIS.....	108
6.	ANHANG	114
6.1	AMINOSÄURE- UND NUKLEOTIDSEQUENZ DER UDP-GLUKOSE-GLUKOSYLTRANSFERASE UGT1 AUS <i>U. MAYDIS</i>	114
6.2	NUKLEOTIDSEQUENZ UND ALIGNMENT DER ISOLIERTEN KLONE pSCOSRED1 UND PCM54RED1 116	
DANKSAGUNG.....		123
LEBENS LAUF		125

1. Einleitung

1.1 *Ustilago maydis* als Modellorganismus

Der Brandpilz *Ustilago maydis* gehört systematisch innerhalb der Klasse der Basidiomyceten in die Ordnung der Ustilaginales. Dieser phytopathogene Pilz besitzt ein enges Wirtsspektrum und befällt nur Mais und Teosinte, die Urform des modernen Mais (Wang *et al.*, 1999), wobei alle oberirdischen Pflanzenabschnitte infiziert werden können. Während er in Europa und den USA als Ernteschädling gilt, sind infizierte Maiskolben in Mexiko unter dem aztekischen Namen „Huitlacoche“ als Delikatesse im Handel erhältlich (Banuett, 1992).

U. maydis nimmt unter den phytopathogenen Pilzen die Rolle eines Modellorganismus ein, da der komplette Lebenszyklus unter kontrollierten Bedingungen in ungefähr drei Wochen nachvollzogen werden kann (Christensen, 1963). Außerdem erleichtert das Vorhandensein eines sexuellen Zyklus genetische Analysen. So spielte die Untersuchung mitotischer Rekombinationsvorgänge in *U. maydis* eine wichtige Rolle bei der Entwicklung eines molekularen Modells der homologen Rekombination (Holliday, 1961b). Ein weiterer Vorteil von *U. maydis* ist die leicht zu kultivierende haploide Form, die es erlaubt, Gene durch Mutationsanalyse zu identifizieren. Außerdem gelang es, für *U. maydis* ein effektives Transformationssystem zu entwickeln und auch die gezielte Deletion von Genen mit Hilfe der homologen Rekombination erfolgt in *U. maydis* mit hoher Effizienz (Tsukuda *et al.*, 1988; Wang *et al.*, 1988) Gleichzeitig ermöglicht die Existenz von diploiden Stämmen die einfache Handhabung von Deletionsmutanten essentieller Gene im heterozygoten Zustand.

1.2 Der Lebenszyklus von *U. maydis*

Im Vergleich zu anderen phytopathogenen Basidiomyceten, wie den Rostpilzen, weist *U. maydis* einen recht einfachen Lebenszyklus auf. In der vegetativen Phase vermehren sich die haploiden Sporidien hefeartig durch Knospung und ernähren sich saprophytisch. Um eine Maispflanze erfolgreich zu infizieren, müssen sich zwei haploide Basidiosporen unterschiedlichen Paarungstyps erkennen, um nach der Zellfusion ein infektiöses dikaryotisches Filament auszubilden. Dieser Vorgang unterliegt der Kontrolle durch die beiden Paarungstyploci *a* und *b* (Übersicht in (Kahmann *et al.*, 2000)). Der *a*-Locus, der in zwei Allelen vorliegt, ist dabei für die gegenseitige Erkennung und die Zellfusion verantwortlich. Der multiallelische *b*-Locus ist für die Aufrechterhaltung des dikaryotischen Filaments und die nachfolgende pathogene Entwicklung notwendig (Banuett, 1995).

Die Basidiosporen unterschiedlichen Paarungstyps erkennen sich mit Hilfe spezifischer Pheromone. Die Wahrnehmung des Pheromons eines kompatiblen Partners führt zur Ausbildung einer Konjugationshyph an einem Pol der Zelle, die vermutlich entlang eines Pheromongradienten auf die jeweilige Zielzelle zuwächst (Snetselaar *et al.*, 1996). Die Konjugationshyphen verschmelzen beim Aufeinandertreffen an ihren Spitzen, was zur Ausbildung eines dikaryotischen Filaments führt (Abb. 1), (Snetselaar and Mims, 1992; Snetselaar, 1993). Das gebildete Dikaryon ist nur dann stabil, wenn die Kerne auch verschiedene Allele des multiallelischen *b*-Locus tragen. In der Natur findet dieses Ereignis wahrscheinlich auf der Blattoberfläche statt (Holliday, 1961a; Snetselaar, 1993). An einer geeigneten Stelle erfolgt eine Penetration in das Pflanzengewebe, wobei eine spezielle Struktur ausgebildet wird, die den Appressorien anderer Pilze, wie z.B. *Magnaporthe grisea* ähnelt (Snetselaar and Mims, 1992; Snetselaar, 1993). Etwa drei Tage nach der Infektion kann beobachtet werden, dass es am Infektionsort der Pflanze zu einer Anthocyanbildung und teilweise auch zu einer Chlorose kommt (Banuett and Herskowitz, 1996). Auf welche Weise sich das dikaryotische Myzel innerhalb der Pflanze vermehrt, ist noch unbekannt (Banuett and Herskowitz, 1996). Eine Schnallenbildung konnte, trotz mancher älterer gegenteiliger Hinweise in *U. maydis* bisher nicht beobachtet werden.

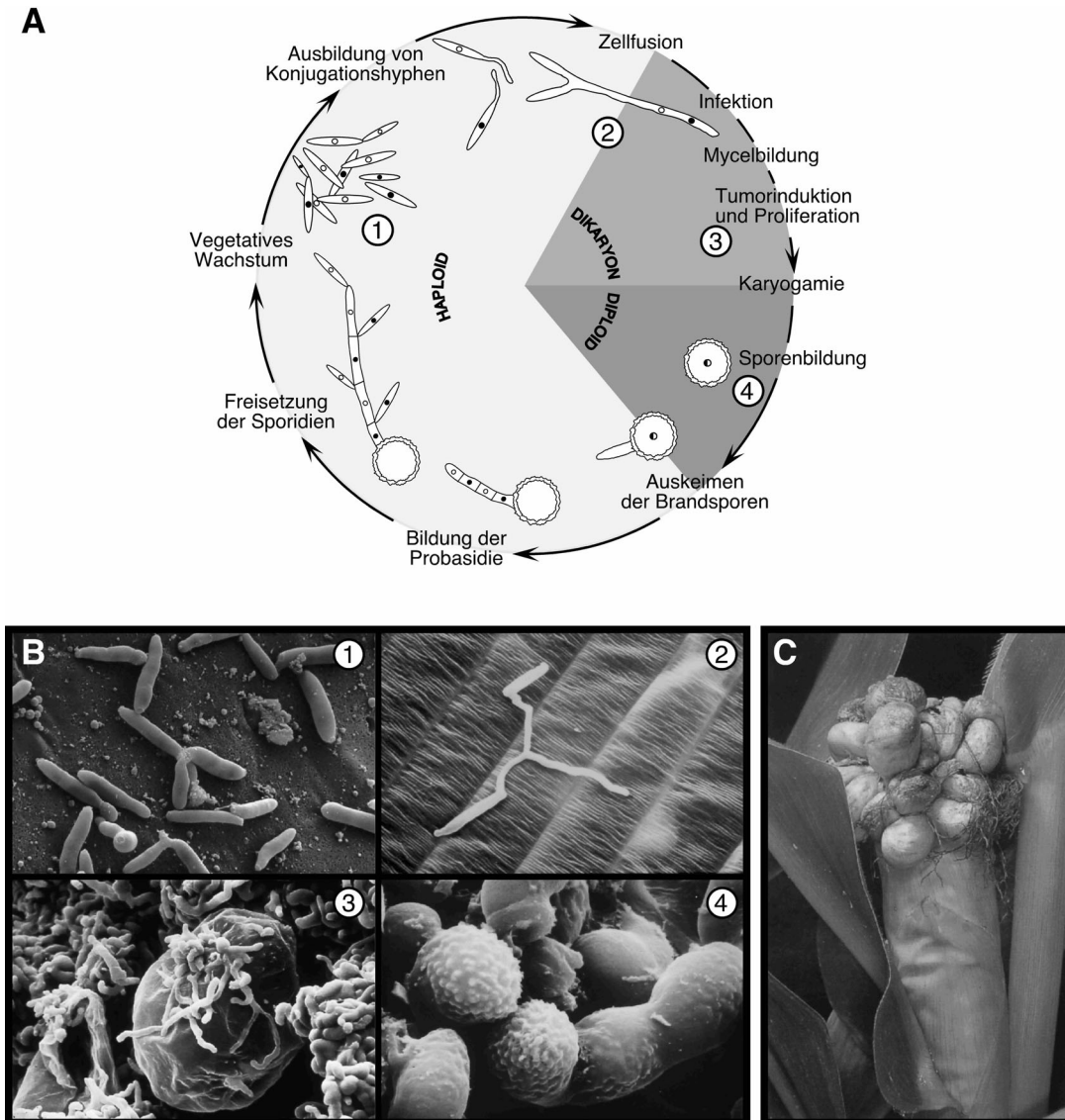


Abbildung 1: Der Lebenszyklus von *U. maydis*. A) Schematische Darstellung des Lebenszyklus (Brachmann, 2001). Die Zahlen beziehen sich auf die entsprechenden Stadien in B). B) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *U. maydis*-Zellen. (1) Haploide Sporidien vermehren sich vegetativ durch Sprossung (mit freundlicher Genehmigung von G. Wanner, C. Quadbeck-Seeger und J. Kämper). (2) Fusion zweier haploider Zellen und Dikaryonbildung auf der Blattoberfläche aus (Snetselaar, 1993). (3) Starke Proliferation des Pilzmyzels im Tumor (mit freundlicher Genehmigung von K. Snetselaar). (4) Bildung der Brandsporen in den sporogenen Hyphen aus (Snetselaar and Mims, 1994). C) Tumorbildung auf einem Maiskolben aus (Murawksi, 2000).

Etwa fünf Tage nach Infektion wird die Bildung von Pflanzengallen („Tumore“) beobachtet, die aus einer großen Zahl von vergrößerten Pflanzenzellen bestehen. Nach ungefähr zehn Tagen beginnen sich die Pilzfilamente innerhalb der Gallen abzurunden. Nach der Kernfusion, die vermutlich während dieses Stadiums erfolgt, werden die einzelnen Zellen in Brandsporen umgewandelt, die einen diploiden Zellkern besitzen (Abb. 1)(Snetselaar and Mims, 1994). Aufgrund der Färbung der Brandsporen erscheint der Tumor zu späten Zeitpunkten schwarz, was zu dem Namen Maisbeulenbrand geführt hat (Abb. 1) (Snetselaar and Mims, 1994). Für einen Tumor mittlerer Größe wurde die Anzahl der darin enthaltenen Brandsporen auf etwa 200 Millionen geschätzt (Christensen, 1963). Die Brandsporen werden nach dem Aufplatzen der Tumore durch Wind und Regen verbreitet und können mehrere Jahre im Boden überdauern (Christensen, 1963). Beim Auskeimen erfolgt die Meiose innerhalb der Probasidie. Von dieser Probasidie aus werden sukzessive die Basidiosporen, die auch als Sporidien bezeichnet werden, abgeschnürt, in welche die vier haploiden Kerne einwandern (Abb. 1)(Christensen, 1963; Huber, 2001). Die haploiden Sporidien ernähren sich saprophytisch und vermehren sich hefeartig durch Sprossung.

1.3 Das tetrapolare Kreuzungssystem von *U. maydis*

U. maydis besitzt ein komplexes Kreuzungssystem, bei dem die Fusion der haploiden Sporidien, die Entstehung und Aufrechterhaltung eines pathogenen Dikaryons durch zwei unabhängige genetische Loci kontrolliert werden, dem *a* Locus und dem *b* Locus.

Der biallelische *a* Locus kodiert für die Pheromonvorstufen Mfa1 (Mating factor a) bzw. Mfa2, sowie für die Pheromonrezeptoren Pra1 (Pheromone receptor a) bzw. Pra2, die die Anwesenheit von Pheromonen des anderen Kreuzungstyps detektieren (Bölker et al., 1992; Spellig et al., 1994). Wie es auch für viele andere pilzliche Pheromone der Fall ist, tragen die Vorläuferproteine eine C-terminale Signalsequenz (CAAX-Box), an der eine posttranslationale Modifikation durch Farnesylierung und Carboxymethylierung erfolgt. Die Pra1- und Pra2-Rezeptoren zeigen hohe Sequenzhomologie zu Ste3, dem Pheromonrezeptor für den farnesylierten **a**-Faktor der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (Bölker et al., 1992).

Die Pheromone von *U. maydis*, die unter Mangelbedingungen von den Zellen sekretiert werden, sind 9- bzw. 13- Aminosäure lange Lipopeptide, welche aufgrund ihrer Aminosäure-Zusammensetzung und des farnesylierten Cysteinrestes sehr hydrophob sind. Nehmen die

Zellen Pheromon von Zellen des anderen Kreuzungstyps wahr, so antworten sie wiederum mit einer verstärkten Sekretion von Pheromonen. In Folge dieser gegenseitigen Pheromonstimulierung beobachtet man die Bildung von Konjugationshyphen, die entlang des Pheromongradienten wachsen bis die Hyphen an ihren Spitzen verschmelzen (Snetselaar et al., 1996).

Der multiallelische *b* Locus kodiert für zwei Gene: *bEast* (*bE*) und *bWest* (*bW*), die in entgegengesetzter Richtung transkribiert werden. Die *bE* und *bW*-Genprodukte weisen einen ähnlichen Aufbau auf: Sie bestehen beide aus einem N-Terminus, der im Vergleich unterschiedlicher *b*-Proteine sehr variabel ist und einem konstanten C-Terminus (90% Identität). Zwischen N- und C-Terminus befindet sich bei beiden Proteinen eine zentral liegende charakteristische Homeodomäne (Kronstad and Leong, 1990)(Gillissen et al., 1992). Außer in diesem Bereich weisen die Aminosäuresequenzen der *bE* und *bW*-Proteine untereinander keine Sequenzhomologien auf. Stammen die von *bE* und *bW* codierten Proteine zweier konjugierender Zellen von unterschiedlichen *b*-Allelen, kommt es durch Wechselwirkung der variablen N-terminalen Regionen zu einer Heterodimerisierung (Kämper et al., 1995). Diese aktiven *bW/bE*-Heterodimere wirken als Transkriptionsaktivator oder – repressor und regulieren die Expression von Genen, die für die Stabilität und Pathogenität des Dikaryons notwendig sind. Es ist jedoch nicht klar, ob die Regulation durch das Heterodimer direkt oder durch eine nachgeschaltete Regulationskaskade geschieht (Kämper et al., 1995). Es wurde festgestellt, dass die Expression sämtlicher Gene der beiden Kreuzungstyploci durch die Pheromonwahrnehmung aktiviert wird. Die entscheidende Rolle spielt hierbei der Transkriptionsfaktor *Prf1* (Pheromone response factor), dessen Aktivität sowohl vom cAMP-Spiegel als auch vom Pheromonsignal selber gesteuert wird (Hartmann et al., 1996; Hartmann et al., 1999). Das Pheromonsignal durchläuft vermutlich eine MAP (Mitogen Activated Protein)-Kinasekaskade und stimuliert zusätzlich über ein heterotrimeres G-Protein und eine Adenylatcyclase den cAMP Signalweg.

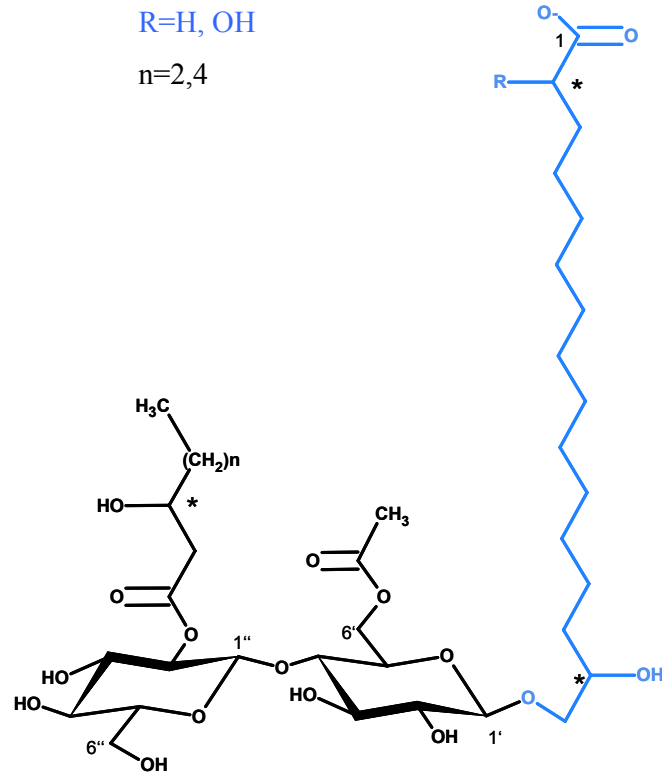
1.4 Glykolipide in *U. maydis*

Die Pheromone von *U. maydis* sind aufgrund ihrer Farnesylierung sehr hydrophob und nur schwer in Wasser löslich. Es stellt sich daher das Problem, wie es in der Natur (z.B. auf der Blattoberfläche) zu der beobachteten Wahrnehmung der Pheromone auch über größere Entfernungen kommt.

Eine effiziente Ausbreitung hydrophober Substanzen an Stoffinterphasen kann mit Hilfe von oberflächenaktiven Substanzen erfolgen. Diese besitzen eine amphipathische Struktur, wirken also als Detergens und können deshalb als Trägersubstanz für hydrophobe Stoffe fungieren.

Bereits seit den 50er Jahren ist bekannt, dass *U. maydis* größere Mengen einer solchen amphipathischen Substanz ausscheidet (bis zu 30g/l). Die chemische Analyse dieser als „Ustilagic acid“ (Ustilaginsäure) bezeichneten Substanz ergab, dass es sich dabei um ein sekretiertes Glykolipid handelt (Lemieux, 1951). Es konnte gezeigt werden, dass die Ustilaginsäure darüber hinaus auch antibiotische und antimykotische Eigenschaften gegen eine Reihe von Mikroorganismen aufweist (Haskins, 1950; Haskins and Thorn, 1951). Chemisch handelt es sich bei der Ustilaginsäure um ein Gemisch verschiedener Cellobiose-Lipide, bei dem die Zucker-Einheit o-glykosidisch an die ω -Hydroxylgruppe der 15, 16-Dihydroxyhexadecansäure bzw. 2, 15, 16-Trihydroxyhexadecansäure gebunden ist. Außerdem ist der Cellobioseanteil noch mit verschiedenen Alkylgruppen verestert (Abbildung 2). Die Ustilaginsäure ist nahezu wasserunlöslich und scheidet sich aus dem Kulturmedium in Form von nadelförmigen Kristallen ab. Neben diesen Cellobiose-Lipiden scheidet *U. maydis* auch Mannosylerythritol-Lipide aus, die in drei Modifikationen (MEL A, MEL B und MEL AB) vorliegen. Sie bestehen aus einer Mannoseeinheit, die glykosidisch mit Erythritol verbunden ist und mehrfach mit Acetylgruppen und anderen ungesättigten Fettsäuren verestert ist. (Abbildung 3).

A



B

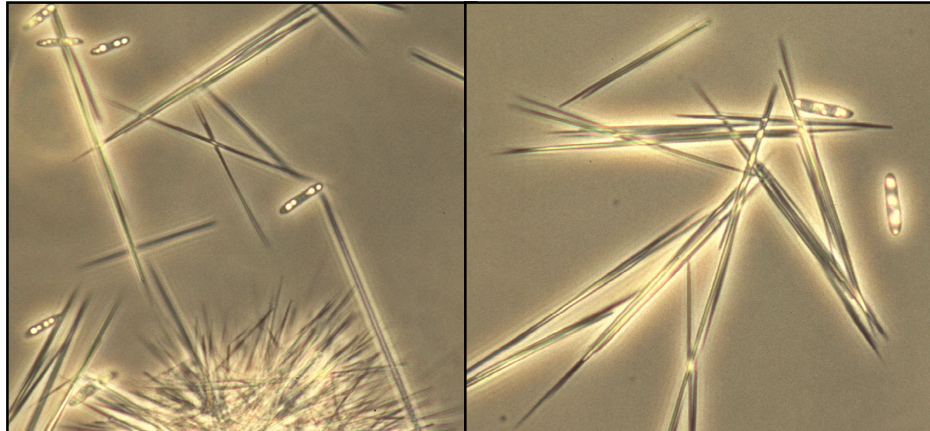


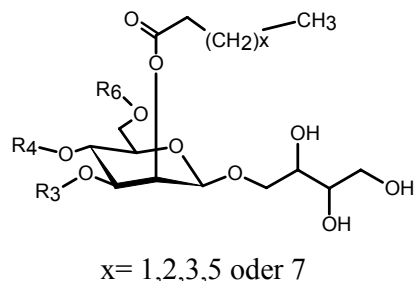
Abbildung 2: Ustilaginsäure. A: Die von *U. maydis* sezernierte Ustilaginsäure besteht aus einer Cellobiose-Einheit, die o-glykosidisch an die ω -Hydroxylgruppe der Di- bzw. Tri-Hydroxyhexadecansäure gebunden ist. Die Cellobioseseinheit trägt zusätzlich Alkyldekorationen, deren Länge variabel ist. Die Hydroxyhexadecansäure ist entweder eine 2,15,16-Trihydroxyhexadecansäure oder eine 15, 16-Dihydroxyhexadecansäure. B: Die Ustilaginsäure wird unter Mangelbedingungen in großen Mengen ausgeschieden, wobei die wasserunlösliche Ustilaginsäure als nadelförmigen Kristalle mikroskopisch sichtbar wird.

Die Ustilaginsäure ist aufgrund ihres Zuckeranteils ein recht ungewöhnliches Glykolipid. Nur von wenigen anderen Mikroorganismen ist bekannt, dass sie ein Cellobiose-Lipid sekretieren. Kürzlich wurde in *Cryptococcus humicola* ein mit der Ustilaginsäure verwandtes Glycolipid beschrieben, das aus einem hoch acetylierten Cellobiose-Rückgrat besteht, welches an die ω -Hydroxylgruppe von α,ω -Dihydroxy-Palmitat gebunden ist. Dieses Glycolipid weist ebenfalls eine mykotische Wirkung gegenüber einem großen Spektrum verschiedener Hefen auf (Puchkov et al., 2002).

Zu Beginn der 50er Jahre stand im Zentrum des wissenschaftlichen Interesses an der Ustilaginsäure zunächst ihre antibiotische Wirkung, die wahrscheinlich auf ihrer hohen Oberflächenaktivität beruht. In Untersuchungen zum antibakteriellen Spektrum von Ustilaginsäure und ihrer medizinische Anwendungsmöglichkeit, erwies sich das Glykolipid als antibiotisch wirksam gegen Bakterien wie *Xanthomonas sp.* und eine Vielzahl von Pilzen, z.B. gegen den phytopathogenen Pilz *Thielaviopsis basicola* (Haskins, 1950; Haskins and Thorn, 1951). *In vivo* Experimente an Ratten waren jedoch enttäuschend, da man feststellen musste, dass eine orale Applikation der Ustilaginsäure nicht möglich ist. Da außerdem Blutserum die antibiotische Aktivität um ein 4- bis 8-faches senkt wäre die benötigte Menge einfach zu groß, als dass sie oral eingenommen werden könnte, (Reed and Holder, 1953). Dies führte zu einem nachlassenden Interesse an der Ustilaginsäure.

Erst in den letzten Jahren fand die Ustilaginsäure unter biotechnologischen Aspekten als ungiftiges und biologisch abbaubares Biodetergens wieder Aufmerksamkeit. Biodetergentien finden Verwendung bei der Produktion pharmazeutischer und kosmetischer Artikel sowie in der Lebensmittelherstellung (Spoeckner et al., 1999). Aufgrund ihrer milden Produktionsbedingungen, strukturellen Komplexität, geringen Giftigkeit gegenüber Eukaryoten und antimikrobiellen Aktivität stellen Glykolipide eine ökologisch attraktive Alternative zu chemisch synthetisierten Detergentien dar (Brakemeier et al., 1998; Makkar and Cameotra, 2002). Der grösste ökologische Vorteil solcher Substanzen ist ihre biologische Abbaubarkeit. Allerdings ist die Produktion synthetisch hergestellter Detergentien zur Zeit immer noch deutlich preiswerter als die Erzeugung von Biodetergentien. Die Produktion von biotechnisch hergestellten Detergentien ist daher unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten erst bei einer drastischen Senkung der Produktionskosten interessant. Untersuchungen zur Verbesserung der Ausbeute bei der Produktion der qualitativ hochwertigen Glycolipide aus *Ustilago maydis* unter Verwendung preiswerter Kohlenstoffquellen wie Melasse und Pflanzenöl wurden in der Arbeitsgruppe von S. Lang an der Universität Braunschweig durchgeführt (Spoeckner et al., 1999; Thorn and Haskins, 1951). Es konnte eine maximale

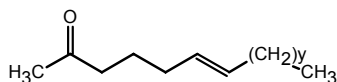
Konversion von 45 g/l Sonnenblumenöl zu 30 g/l Glykolipiden erzielt werden (Spoeckner *et al.*, 1999). Die bei diesen Versuchen erhaltenen Glykolipide bestanden aber zum grössten Teil nicht aus Cellobiose-Lipiden, sondern aus den ebenfalls oberflächenaktiven Mannosylerythritol-Lipiden (Spoeckner *et al.*, 1999).



MEL A: R4, R6 = Acetyl

y = 5-11, aber nicht 6

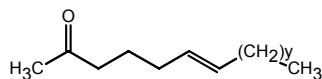
R3 =



MEL B: R4 = Acetyl, R6 = H

y = 5-11, aber nicht 6

R3 =



MEL AB: R4 = H, R6 = Acetyl

y = 4-10

R3 =

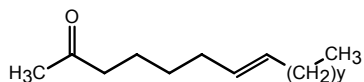


Abbildung 3: Struktur der Mannosylerythritol-Lipide. Die Mannosylerythritol-Lipide liegen in drei Modifikationen vor (MEL A; MEL B und MEL AB). Sie bestehen aus dem Zucker Mannose, der mit Alkylgruppen dekoriert ist und aus einem Lipidanteil mit ungesättigter Fettsäure von variabler Länge.

Bis auf ihre Struktur und Methoden zur Isolierung ist die Ustilaginsäure nicht weiter erforscht. Weder die Biosynthese noch die biologische Funktion der Ustilaginsäure ist bisher bekannt.

Welche biologische Rolle die Produktion von Biodetergentien für die Mikroorganismen spielt, konnte bisher nur in Einzelfällen aufgeklärt werden. Insbesondere die genetischen

Grundlagen der Biosynthese und ihrer Regulation sind nur in ganz wenigen Fällen untersucht (Ron and Rosenberg, 2001).

1.5 Biodetergentien

Oberflächenaktive Substanzen sammeln sich aufgrund ihrer amphipathischen Struktur überwiegend an Stoffinterphasen, also Oberflächen an. Es ist nicht überraschend, dass Bakterien, die an Grenzflächen wachsen oder Biofilme auf hydrophoben Oberflächen bilden, häufig eine Vielzahl von oberflächenaktiven Substanzen, also mikrobielle Biodetergentien, produzieren.

Die Funktion der Biodetergentien wird auf unterschiedliche Weise erklärt. So wird auf die Verbesserung der Aufnahme hydrophober Substanzen und die Anheftung an hydrophobe Oberflächen verwiesen (Neu *et al.*, 1992). Die bereits erwähnte antibiotische Wirkung kann die Hauptfunktion darstellen, oder aber eine erwünschte Nebenwirkung darstellen. Grundsätzlich ist deshalb anzunehmen, dass die biologische Funktion ebenso variiert wie die Physiologie und Ökologie der Biodetergenz-produzierenden Mikroorganismen.

In der Biotechnologie spielen Biodetergentien produzierende Mikroorganismen eine wichtige Rolle und werden insbesondere bei der Dekontamination verschmutzter Gewässer oder Böden von Kohlenwasserstoffen wie z.B. Erdöl, eingesetzt. Durch die ausgeschiedenen Detergentien sind Mikroorganismen in der Lage, hydrophobe Substanzen aus dem Ölgemisch zu lösen. (Geiselbrecht *et al.*, 1996). So ist *P. aeruginosa* maßgeblich beim Abbau polyaromatischer Kohlenwasserstoffe beteiligt, indem es deren Löslichkeit durch das ausgeschiedene Rhamnolipid heraufsetzt (Desai and Banat, 1997). Das Lipopeptid Alasan, das von *Acinetobacter radioresistens* ausgeschieden wird erhöht ebenfalls die Löslichkeit von Kohlenwasserstoffen um das bis zu 20fache und beschleunigt deren Abbau signifikant (Barkay *et al.*, 1999; Lin, 1996; Rosenberg and Ron, 1999). Eine weitere biologische Bedeutung könnte Biodetergentien bei der Entgiftung des Bodens zukommen. So konnte gezeigt werden, dass das Rhamnolipide in der Lage sind, Kadmium, Blei und Zink aus dem Boden zu entfernen. Dies wird darauf zurückgeführt, dass es diese Metalle komplexiert und so dem Boden entzieht. Eine Vielzahl anderer oberflächenaktiver Lipopeptide zeigt starke antibiotische Aktivität (Marahiel *et al.*, 1993; Tsuge *et al.*, 1996; Yakimov *et al.*, 1998). Deshalb wird angenommen, dass die Produktion solcher Substanzen auch für die erfolgreiche

Kompetition mit anderen Mikroorganismen wichtig ist (Reed and Holder, 1953). Da Detergentien die Oberflächenspannung herabsetzen, können sie dadurch die Oberflächen so verändern, dass andere Mikroorganismen nicht mehr in der Lage sind, sich daran anzulagern (Zhang and Miller, 1994). Andererseits können sich Mikroorganismen durch Biodetergens-Produktion hydrophobe Umgebungsoberflächen als Lebensraum erschließen (Neu *et al.*, 1992). Auch bei der Interaktion pathogener Mikroorganismen mit ihren Wirten, können Biodetergentien eine Rolle spielen. So wird das Rhamnolipid aus *P. aeruginosa* als „virulence-associated exoproduct“ diskutiert, das unter anderem auch die Synthese anderer Virulenz-Faktoren wie Elastase und LasA-Protease kontrolliert (Brint and Ohman, 1995).

Zur Isolierung und Selektion von Biodetergens-produzierenden Mikroorganismen wurden verschiedene Detektionsmethoden entwickelt, die auf den chemischen und physikalischen Eigenschaften dieser Stoffe basieren. Anionische Tenside bilden zusammen mit dem kationischen Tensid Cetyl-trimethyl-ammonium-bromid (CTAB) einen unlöslichen Komplex, der auf Platten durch den basischen Farbstoff Methyleneblau als blauer Ring um die Kolonie sichtbar gemacht werden kann (Siegmond and Wagner, 1991). Eine andere Detektionsmethode für Biodetergenz produzierende Mikroorganismen beruht auf der hämolysierenden Wirkung der Detergenzien. Die roten Blutkörperchen reagieren sehr empfindlich auf oberflächenaktive Substanzen. Sie werden durch die Detergenzien zerstört, was in einer Hämolyse sichtbar wird. So können Biodetergens-produzierende Mikroorganismen aufgrund ihrer hämolytischen Aktivität auf Blutagarplatten selektiert werden (Carillo *et al.*, 1996).

Mikrobielle Biodetergentien werden unterteilt in die „low-molecular-weight molecules“ und „high-molecular-weight polymers“ (Ron and Rosenberg, 2001; Rosenberg and Ron, 1999). Letztere werden von den Mikroorganismen in der Regel dazu genutzt, an hydrophobe Stoffe oder Vesikel zu binden, um sie zu resuspendieren, während erstere dazu dienen, die Oberflächenspannung der umgebenden Flüssigkeit herabzusetzen. Viele „high-molecular-weight“-Biodetergentien wirken deshalb als Emulgatoren und sind aus Polysacchariden, Proteinen, Lipopolysacchariden und Lipoproteinen zusammengesetzt. Die bekanntesten Emulgatoren werden von *Acinetobacter*-Spezies produziert (Sar and E., 1983) und sind unter Namen wie Rag-1-Emulsan, Alasan oder Biodispersan im Handel. Biodispersan wird z.B. als Emulgator für Calciumcarbonat in Wasser verwendet (Ron and Rosenberg, 2001; Rosenberg and Ron, 1999).

„low-molecular-weight“-Biodetergentien sind in der Regel Glykolipide oder Lipopeptide. Die bekanntesten Glykolipide sind die von *Pseudomonas aeruginosa* produzierten Rhamnolipide,

die von *Rhodococcus erythropolis* erzeugten Trehalolipide und Sophoroselipide, die von *Candida bombicola* sekretiert werden (Ron and Rosenberg, 2001). Sie bestehen jeweils aus Disacchariden, die mit einer langkettigen Fettsäure oder Hydroxyfettsäure verknüpft sind (Ron and Rosenberg, 2001; Rosenberg and Ron, 1999). Lipopeptide zeichnen sich durch eine hohe antibiotische Aktivität aus, die auf die hohe Oberflächenaktivität zurückgeführt wird. Gramicidin aus *Bacillus brevis* (Suzuki, 1969) ist ein weit verbreitetes medizinisch eingesetztes Antibiotikum. *Bacillus subtilis* produziert das zyklische Lipopeptid Surfactin (Peypoux *et al.*, 1999), dass als Biodetergens mit der stärksten Oberflächenaktivität gilt (Cooper and Zajic, 1980). Andere Lipopeptide sind z.B. Streptofactin aus *Streptomyces tendae* (Richter *et al.*, 1998), und Viscosin aus *Pseudomonas*-Stämmen (Neu *et al.*, 1992). Die genetische Grundlage und die Regulation der Rhamnolipid-Produktion konnte in *P. aeruginosa* auf molekularer Ebene aufgeklärt werden (Ochsner *et al.*, 1994), (Ochsner and Reiser, 1995). Die Rhamnolipid-Synthese-Gene aus *P. aeruginosa* liegen in einem Operon vor (*rhlABR*), außerdem sind noch weitere Gene zusätzlich beteiligt, wie z.B. *rhlG*, das für eine zur Fettsäuresynthese benötigte NADPH-abhängige β -Ketoacyl-acyl-Carrier-Protein(ACP)-Reduktase kodiert (Campos-Garcia *et al.*, 1998; Ren *et al.*, 2000). Deletionsmutanten in *rhlG* zeigten, dass der Fettsäurestoffwechsel nicht betroffen, aber die Rhamnolipidsynthese vollständig inhibiert wurde, was den Rückschluss zulässt, dass die Fettsäureeinheit des Rhamnolipids unabhängig von der generellen Fettsäuresynthese synthetisiert wird. Im *rhlABR*-Gencluster konnten die bereits durch biochemische Analyse identifizierten Rhamnosyltransferasen, die die Bildung der glykosidischen Bindung katalysieren, lokalisiert werden (Ochsner *et al.*, 1994; Ron and Rosenberg, 2001). Zusätzlich zu diesen Rhamnosyltransferasen finden sich in dem *rhlABR*-Gencluster regulative Elemente (*rhlR* und *rhlL*) (Branny *et al.*, 2001; Latifi *et al.*, 1995; Latifi *et al.*, 1996; Pearson *et al.*, 1997; Pesci *et al.*, 1997).

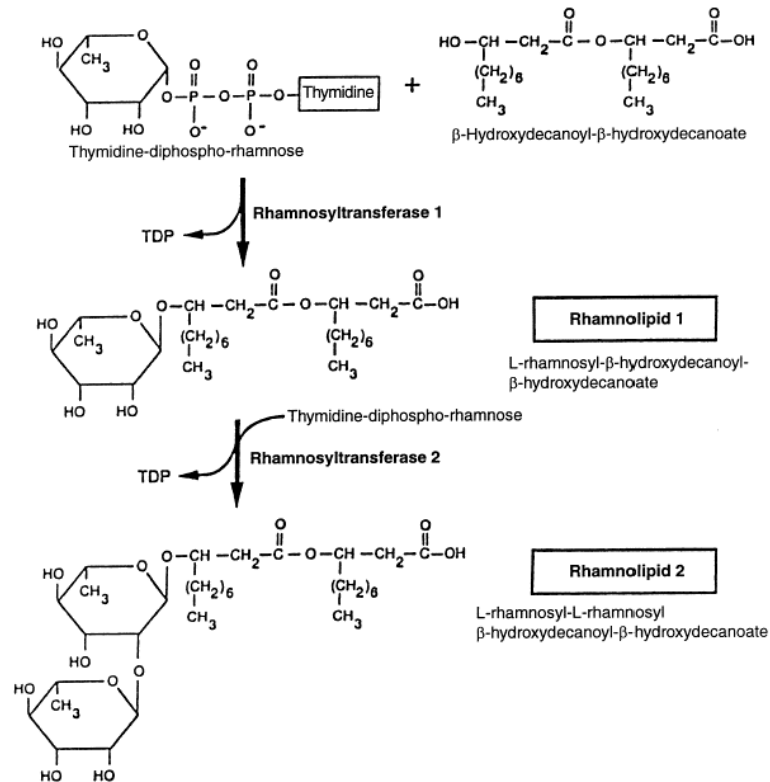


Abbildung 4: Biosynthese des Rhamnolipids 1 und 2 in *P. aeruginosa*. Die Rhamnosyltransferase katalysiert den Transfer der Rhamnose von TDP-Rhamnose auf die Fettsäureeinheit. Die Rhamnosyltransferase2 katalysiert den Transfer der zweiten Rhamnoseeinheit auf das Rhamnolipid 1. TDP: Thymidindiphosphat. Aus Lang und Wullbrandt (1999)

Ebenso gelang es, die für die Biosynthese des Surfactins in *B. subtilis* verantwortlichen Gene zu identifizieren. Surfactin ist ein zyklisches Heptapeptid, an das eine Fettsäure gebunden ist (Konz *et al.*, 1999). Die Peptid-Einheit wird nicht-ribosomal durch einen Multienzym-Peptid-Synthetase-Komplex synthetisiert. Dabei wird die Surfactin-Biosynthese durch das *surfA*-Operon kodiert, welches mit über 25 kb für eine Peptid-Synthetase mit repetitiven Domänen kodiert, die parallel zur Funktion und Reihenfolge der Aminosäuren im Surfactin vorliegen (Marahiel *et al.*, 1993); (Konz and Marahiel, 1999; Yakimov *et al.*, 1998). Die Acyltransferase, welche die Fettsäureeinheit an das Peptid bindet, ist bisher nicht identifiziert.

Bei beiden Bakterien zeigte sich, dass die Biodetergens-Produktion durch Signale induziert wird, die auch am „quorum sensing“ beteiligt sind (Branny *et al.*, 2001; Pearson *et al.*, 1997; Pearson, 2002; Peypoux *et al.*, 1999). Für diese Ergebnisse spricht ebenfalls, dass die

Biodetergens-Produktion häufig erst in der stationären Wachstumsphase beginnt (Ron and Rosenberg, 2001).

Es konnten Mutanten erzeugt werden, die einen Defekt in der Biodetergens-Produktion aufweisen. Allerdings zeigte es sich, dass es schwierig ist ein Screening auf solche Mutanten durchzuführen, da der Verlust der Biodetergenz-Produktion zu einem nur schwer selektierbaren Phänotyp führt (Ron and Rosenberg, 2001).

In Pilzen sind bisher nur wenige Informationen über die Biosynthese von Glykolipiden bekannt. Biochemisch konnten in *Candida bogoriensis* Enzyme nachgewiesen werden, die an der Bildung der glykosidischen Bindungen des Sophoroselipids beteiligt sind. Es konnte eine Glukosyltransferase angereichert werden, die *in vitro* die Bildung der glykosidischen Bindung durch Übertragung einer aktivierten UDP-Glucoseeinheit auf 13-hydroxydocosanoic-acid katalysiert. Die Übertragung der zweiten Zuckereinheit erfolgt vermutlich durch eine zweite Untereinheit des gereinigten Komplexes (Breithaupt and Light, 1982; Esders and Light, 1972). Allerdings konnten die Enzymaktivitäten nicht soweit aufgereinigt werden, dass eine molekulare Analyse möglich gewesen wäre.

Glykosyltransferasen sind Schlüsselenzyme bei der Synthese von Glykolipiden und werden deshalb im folgenden Abschnitt gesondert vorgestellt.

1.6 Glykosyltransferasen

Glykosyltransferasen katalysieren die Synthese von Glukokonjugaten durch Transfer eines aktivierten Zuckers (z.B. UDP-Glukose oder TDP-Rhamnose) auf ein geeignetes Akzeptormolekül. Das Akzeptormolekül kann ein Lipid, Protein oder Polysaccharid sein. Aufgrund der hohen Substratspezifität der Reaktion wird angenommen, dass die Enzyme passende Erkennungsstellen sowohl für den Donor als auch den Akzeptor tragen.

Glykosyltransferasen können nach ihrem Reaktionsmechanismus in zwei große Gruppen unterteilt werden: Nichtinvertierende Glykosyltransferasen, bei denen das Asymmetriezentrum am Zucker beibehalten wird, und invertierende Glykosyltransferasen, bei denen die Stereokonfiguration während der Reaktion invertiert wird. In den invertierenden Glykosyltransferasen konnte eine konservierte Domäne identifiziert werden, die für die Erkennung des aktivierten Zuckers verantwortlich ist. Diese Domäne wurde „Nucleotide

Recognition Domain 1 β " oder NRD 1 β genannt und konnte in 140 Glykosyltransferasen identifiziert werden. Nichtinvertierende Glykosyltransferasen enthalten eine abweichende Form dieser Erkennungsregion, die als NRD 1 α bezeichnet wurde und in 77 Glykosyltransferasen detektiert wurde. Dabei ist die zentrale Domäne beider Nukleotid-Erkennungsbereiche ähnlich. Eine dritte konservierte Domäne, NRD2, ist charakteristisch für membrangebundene Glykosyltransferasen. Die drei Domänen NRD 1 β , NRD 1 α und NRD 2 konnten in Glykosyltransferasen von Archea, Eubakterien und Eukaryoten nachgewiesen werden. Da die Glykosylierungsreaktion auch in Bezug auf die Substraterkennung hoch spezifisch ist, muss auch jede Glykosyltransferase eine eigene Domäne für die Substraterkennung beinhalten.

Eine wichtige Funktion spielen Glykosyltransferasen bei der Modifizierung sekretierter Proteine. Dabei sind die aus einem naszierenden Protein und dem glykosidisch daran gebundenem Oligosaccharid bestehenden Glykane Voraussetzung für die richtige Faltung, Qualität und Verteilung des Proteins. Die Prozessierung der Proteine erfolgt im endoplasmatischen Retikulum (ER); im Golgi-Apparat erfahren sie weitere Modifikationen. Diese Glykosylierungen führen zu der überaus großen Vielfalt an Funktionen bei reifen Glykoproteinen (Helenius and Aebi, 2001). Bei den Glykoproteinen unterscheidet man zwischen O-gebundenen und N-gebundenen Oligosacchariden. Die Bindung der O-gebundenen Oligosaccharide findet an den Hydroxylgruppen der Aminosäuren Serin-, Threonin- oder Hydroxylysin statt. Diese Zuckerketten sind im Allgemeinen sehr kurz. O-gebundene Zucker werden in einem Schritt an das Akzeptorprotein gebunden und jeder Zuckertransfer wird durch unterschiedliche Glykosyltransferasen katalysiert. N-gebundene Oligosaccharide sind hingegen viel komplexer. Die Synthese beginnt an der cytosolischen Seite des ER durch Transfer der Zuckerreste an ein Dolicholphosphat. Wenn zwei N-Acetylglukosamine und fünf Mannosereste angehängt sind, dreht sich der Komplex in das Lumen des ER. Durch den Transfer von sieben weiteren Zuckerresten, die von Lipid-Vorgängern übertragen werden, reift das Oligosaccharid und wird dann vom Dolichol-Donorlipid auf den Asparaginrest des naszierenden Proteins übertragen (Aebi and Hennet, 2001).

Im Vergleich hierzu sind die Glykosylierungsreaktion von Glykolipiden und die daran beteiligten Glykosyltransferasen hochspezifisch. Dabei bezieht sich die Spezifität der Substraterkennung sowohl auf das Zuckernukleotid und dessen Konformation, als auch auf die Akzeptorlipiderkennung. Ein Vergleich der Protein-Sequenz von

Sterolglukosyltransferasen der Organismen *A. thaliana*, *A. sativa*, *C. albicans*, *S. cerevisiae*, *P. pastoris* und *D. discoideum* zeigte, dass der N-Terminus nur geringe Sequenzähnlichkeiten enthält, während der C-Terminus signifikante Ähnlichkeiten zeigte. Im C-Terminus konnten fünf hochkonservierte Bereiche identifiziert werden. Davon wurde ein Bereich als putative Steroid-Bindungs-Domäne postuliert und die vier anderen Bereiche korrespondieren mit charakteristischen Konsensussequenzen die für UDP-Glykosyltransferasen typisch sind (Campbell *et al.*, 1997). Sie könnten den Bereich der UDP-Glukose-Bindungsdomäne miteinschließen (Warnecke *et al.*, 1999). Eine Nukleotid-Bindungsdomäne konnte bisher für keine Glykolipid-Glykosyltransferase identifiziert werden. Aus anderen Glykosyltransferasen ist ein hochkonserviertes Aminosäure-Motiv „D...D(x)D“ bekannt, das mit UDP interagiert (Charnock *et al.*, 2001).

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, die biologische Funktion der von *U. maydis* in großen Mengen sezernierten Ustilaginsäure zu untersuchen. Dazu sollten *U. maydis* Mutanten generiert werden, die nicht mehr in der Lage sind, Ustilaginsäure zu produzieren.

Zur gezielten Herstellung einer Ustilaginsäure defizienten Mutante sollte ein Schlüsselenzym gesucht werden, das an der Ustilaginsäure-Biosynthese beteiligt ist. Da vermutlich ein zentraler Schritt der Ustilaginsäure-Biosynthese in der Übertragung einer Glukose-Seitenkette auf die Hydroxyfettsäure besteht, sollte ein an diesem Glykosyierungsschritt beteiligtes Enzym aus *U. maydis* isoliert werden. Nach Ansequenzierung des gereinigten Proteins sollte das verantwortliche Glukosyltransferase-Gen identifiziert und eine Deletionsmutante konstruiert werden. Untersuchungen dieser Deletionsmutante sollten Hinweise auf die Bedeutung der Ustilaginsäureproduktion während der Kreuzungsreaktion und bei der pathogenen Entwicklung geben.

Des weitere sollte versucht werden, einen Ustilaginsäure defizienten *U. maydis* Stamm durch ungerichtete Mutagenese zu erhalten. Um diese selektieren zu können, sollte zuerst ein Platten-Detektionsverfahren entwickelt werden, indem Ustilaginsäure-produzierende von Ustilaginsäure-defizienten Stämmen unterschieden werden können. Die Identifizierung der betroffenen Gene sollte durch Komplementation mit einer Genbank erfolgen. Mit Hilfe dieser entdeckten Gene sollte es möglich werden die Biosynthese der Ustilaginsäure und deren Regulation aufzuklären.

2. Ergebnisse

2.1 Isolierung und Charakterisierung der Ustilaginsäure

Um die biologische Bedeutung der von *U. maydis* Zellen in großen Mengen produzierten Ustilaginsäure aufzuklären, sollte ein Stamm hergestellt werden, der nicht mehr in der Lage ist, Ustilaginsäure zu produzieren. Hierzu sollte mittels eines biochemischen Ansatzes ein Schlüsselenzym der Ustilaginsäure-Biosynthese isoliert werden. Nach erfolgreicher Aufreinigung sollte mit Hilfe der Proteinsequenz dieses Schlüsselenzyms die Gensequenz ermittelt werden. Ausgehend von der genomischen Sequenz sollte durch einen revers genetischen Ansatz eine Deletionsmutante erzeugt werden. Von der Analyse ihres Phänotyps wurden Hinweise auf die biologische Bedeutung der Ustilaginsäure innerhalb des Lebenszyklus von *U. maydis* erwartet.

Um die Untersuchungen zu erleichtern, sollte ein *U. maydis* Stamm benutzt werden, der große Mengen Ustilaginsäure ausscheidet. Außerdem sollten die Medienbedingungen optimiert werden, unter denen Ustilaginsäure produziert wird. Es war bereits bekannt, dass Ustilaginsäure unter Stickstoff limitierten Bedingungen ausgeschieden wird. Als stickstofffreies Medium wurde YNB-Medium mit 5 % Glukose als Kohlenstoffquelle eingesetzt. Die Ausscheidung der Ustilaginsäure konnte bei einer Inkubationstemperatur von 28 °C anhand der langen nadelförmigen Kristalle mikroskopisch direkt beobachtet werden (Haskins, 1955)

Es fiel auf, dass die Bildung der Ustilaginsäure sehr stammabhängig war. Bei den Wildisolaten MB195-MB215 konnten innerhalb weniger Tage eine Ausscheidung der Ustilaginsäure beobachtet werden, während die Laborstämme FB1, FB2 und FBD11 erst nach drei Tagen Ustilaginsäure produzierten. Der Stamm MB215 produzierte bereits nach 24 h nachweisbare Mengen an Ustilaginsäure und in den folgenden Tagen so viel Ustilaginsäure, dass die Kultur dickflüssig wurde. Aufgrund der hohen Ustilaginsäureproduktion wurde dieser Stamm für die weiteren Untersuchungen ausgewählt.

2.1.1 Reinigung der Ustilaginsäure

Ustilago maydis produziert je nach Medienzusammensetzung und Kultivierungsbedingungen unterschiedliche Mengen und Verhältnisse der beiden Glykolipidfamilien. Der unterschiedliche der einzelnen Ustilaginsäure-Modifikationen und auch der Mannosylerythritol-Lipide wird zum grössten Teil durch die Auswahl der Substrate, insbesondere der ausgewählten Kohlenstoffquelle, bestimmt (Spoeckner *et al.*, 1999). Daher kann man annehmen, dass auch die Aktivität der beteiligten Enzyme dementsprechend variiert. Um für die folgenden Untersuchungen sicher zu gehen, dass Ustilaginsäure der Hauptbestandteil der produzierten Glykolipide ist, wurde die Medienzusammensetzung so gewählt, dass möglichst viel Ustilaginsäure und nur wenige Mannosylerythritol-Lipide produziert werden. Dies wurde erreicht, indem Glukose als Kohlenstoffquelle eingesetzt wurde. Verwendet man Pflanzenöl, wie zum Beispiel Sonnenblumenöl als Kohlenstoffquelle, so werden vermehrt Mannosylerythritol-Lipide gebildet (Spoeckner *et al.*, 1999).

Um den Nachweis zu erbringen, dass es sich bei den mikroskopisch beobachteten Kristallen um Ustilaginsäure handelt, wurden diese nach dem Protokoll von Haskins aufgereinigt (Haskins, 1955).

Die Reinigung beruht auf der unterschiedlichen Löslichkeit der Ustilaginsäure in Methanol und Wasser. Es handelt sich dabei um eine Umkristallisation. Aus 1 l Kultur wurden die Zellen abzentrifugiert und der Überstand auf 30°C erwärmt. Nach Zugabe von 200 ml 30°C warmen Methanol wird erneut abzentrifugiert und dieses Gemisch auf 50°C erhitzt. Nach Zugabe von 10,5 l 50 °C warmen H_2O_{bidest} wurde die Lösung über Nacht auf RT abgekühlt, wobei die Ustilaginsäure flockenartig auskristallisiert. Diese wurde abzentrifugiert und das Präzipitat mit 200 ml H_2O_{bidest} gewaschen. Nach einem letzten Waschschrift mit 20 ml Ether wird die Ustilaginsäure getrocknet und kühl gelagert. Aus 1 l Kultur des Stammes MB215 in YNB+5% Glukose konnten bis zu 4 g Ustilaginsäure gereinigt werden.

Chromatographie der gereinigten Ustilaginsäure (Ustilaginsäure)

Die gereinigte Ustilaginsäure wurde mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (TLC) untersucht und ihre chemische Zusammensetzung durch Massenspektroskopie bestätigt.

Hierzu wurde 10 mg Ustilaginsäure in Methanol gelöst und auf eine Silicagel Platte aufgetragen. Als Laufmittel zur Auftrennung der Ustilaginsäure wurde ein Gemisch aus Chloroform: Methanol: H_2O (65:15:4) verwendet. Zur Detektion wurde die Silicagel Platte mit der aufgetrennten Ustilaginsäure mit einem Anisaldehyd-Eisessig- H_2SO_4 Gemisch (0,5:50:1) besprüht und drei Minuten auf 150 °C erhitzt. Hierbei wird der Zuckeranteil der

Glykolipide verbrannt und die Glykolipide werden als dunkle Banden sichtbar (Frautz *et al.*, 1984; Spoeckner *et al.*, 1999). In der TLC der gereinigten Ustilaginsäure konnte die Ustilaginsäure soweit aufgetrennt werden (Abb.1A), dass alle vier Varianten der Ustilaginsäure sichtbar wurden.

Um die Gesamtmenge der produzierten Ustilaginsäure einfach zu bestimmen, wurde eine Methode entwickelt, bei der die Ustilaginsäure direkt aus der Kultur extrahiert wurde. Hierzu wurden 0,5 ml Kultur mit 0,5 ml Ethylacetat versetzt und gemischt. Nach Zentrifugation wurde die obere Ethylacetatphase vorsichtig abgenommen und bei 70° C eingedampft. Der Rückstand wurde in 15 µl Methanol aufgenommen und auf die TLC-Platte aufgetragen. Die gereinigte Ustilaginsäure diente dabei als Kontrolle. In der nachfolgenden TLC wurden die Ethylacetat-löslichen Lipide aufgetrennt und anschliessend mit einem Farbreagens die Glykolipide nachgewiesen. Durch diesen direkten Nachweis konnte der Ustilaginsäure-Nachweis wesentlich vereinfacht werden und die Banden durch Vergleich mit der Auftrennung der gereinigten Ustilaginsäure zugeordnet werden (Abb.1b). Neben der Ustilaginsäure werden bei dieser Methode auch Mannosylerythritol-Lipide detektiert, die unter den verwendeten Kulturbedingungen ebenfalls produziert werden. (Spoeckner *et al.*, 1999) (Abb.1b). Außer der Ustilaginsäure und den Mannosylerythritol-Lipiden wurde noch eine deutliche Bande unterhalb der Ustilaginsäure-Bande detektiert, die nicht zugeordnet werden konnte. Da sie aber auch unter Bedingungen auftrat, unter denen es nicht zu einer nennenswerten Bildung der Ustilaginsäure kommt, ist anzunehmen, dass es sich bei diesem Lipid nicht um ein Zwischenprodukt der Ustilaginsäure-Bildung handelt. Da diese Banden in allen Proben eine konstante Konzentration aufwies, wurde sie als interne Zell-Mengen-Auftragskontrolle genutzt.

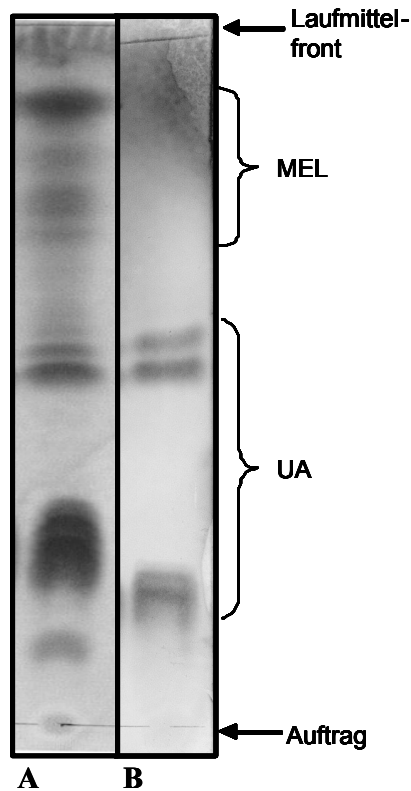


Abbildung 5: Dünnschichtchromatogramm der Ustilaginsäure. **A:** Ethylacetat extrahierte Glykolipide aus einer MB215-Kultur. **B:** 10 mg gereinigte Ustilaginsäure wurde in Methanol gelöst und auf die TLC aufgetragen.

Mit Hilfe einer Ethylacetat-Extraktion konnte bestätigt werden, dass unter diesen Bedingungen die Ustilaginsäure den Hauptanteil der Glykolipide ausmacht (Daten nicht gezeigt). Die Mannosylerythritol-Lipide Banden traten erst nach drei Tagen Inkubation in deutlichen Mengen auf.

Massenspektrometrische Analyse der gereinigten Ustilaginsäure

Von der gereinigten Ustilaginsäure wurde ein Massenspektrum aufgenommen. Für den Nachweis von Zuckern und Zuckerderivaten hat sich die Maldi-TOF-(Matrix assisted Laserdesorption/Ionisation-Time of Flight Mass-Spectrometry) Massenspektrometrie als geeignete Methode herausgestellt, da sie sich besonders zur Analyse nicht flüchtiger und thermisch labiler Substanzen eignet (Dr. Thorsten Selmer, pers. Mitteilung; (Chankvetadze et al., 1996). In der Maldi-TOF Massenspektrometrie wird die in einer Matrix eingebettete Probe durch Laserstrahlung verflüchtigt und durch Ionisation aufgeladen. Die enthaltenen Substanzen werden als geladene Partikel nach ihrem Masse-Ladungsverhältnis aufgetrennt. Mit Hilfe der Massenbestimmung der gereinigten Ustilaginsäure konnten die Banden der Ustilaginsäure-TCL eindeutig zugeordnet werden. Im Massenspektrum der gereinigten Ustilaginsäure sind deutlich die vier beschriebenen Variationen der Ustilaginsäure zu erkennen.

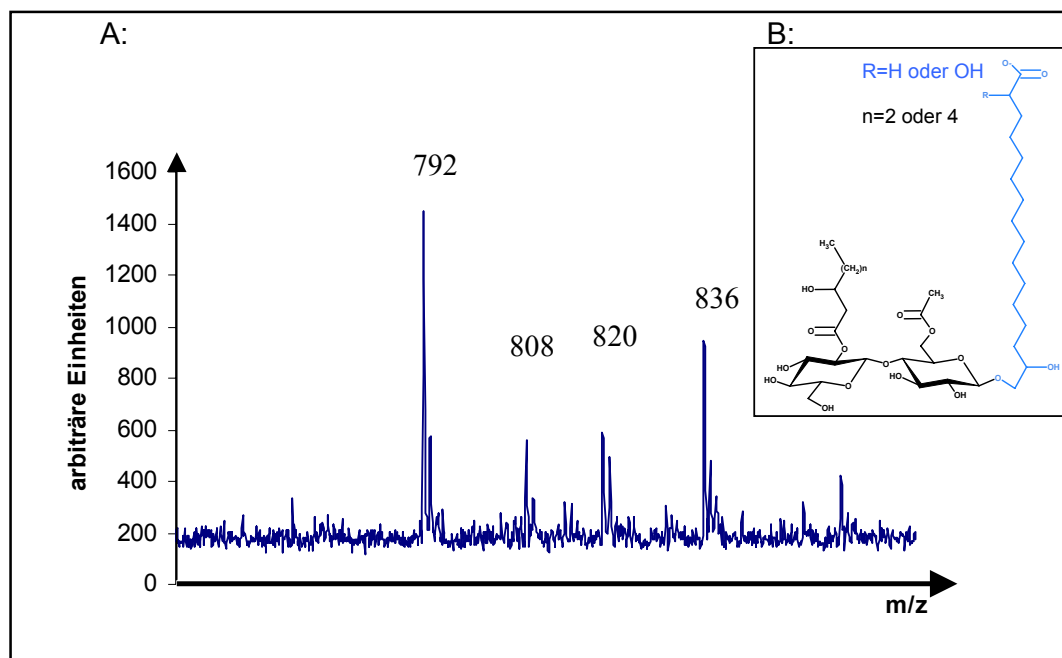


Abbildung 6: MultiTOF Massenspektrum der gereinigten Ustilaginsäure. A: Die angegebenen Werte der Masse sind zusammengesetzt aus der Masse der ionisierten Probe und der Masse des komplexierten Gegenions Na^+ . 792 g/mol = Ustilaginsäure ($\text{R}=\text{H}$, $n=2$), 808 g/mol = Ustilaginsäure ($\text{R}=\text{OH}$, $n=2$), 820 g/mol = Ustilaginsäure ($\text{R}=\text{H}$, $n=4$), 836 g/mol = Ustilaginsäure ($\text{R}=\text{OH}$, $n=4$). B: Struktur der Ustilaginsäure und deren Variationen.

Das Grundgerüst der Ustilaginsäure besteht aus einer Cellobiose, die an einem Zucker acetyliert und an dem anderen Zucker mit einer 6-bzw. 8-C-Atomen langen Seitenkette verestert ist. Am C_1' -Atom der Cellobiose ist diese o-glykosidisch mit der ω -Hydroxylgruppe der 15,16-Dihydroxyhexadekansäure bzw. einer 2,15,16-Trihydroxyhexadekansäure verbunden. Dabei entspricht der kleinste Peak der Variante, die eine 6er Kette am Zucker trägt und keine Hydroxylgruppe an C_2 der Fettsäure aufweist. Dies ergibt eine berechnete Masse von 769 g/mol. Zusammen mit der Masse des bei dieser Methode auftretenden Gegenions Na^+ (23 g/mol) ergibt das die Masse 792 g/mol. Der zweite „Peak“ kann der Ustilaginsäure mit der Masse 785 g/mol $+\text{Na}^+ = 808$ g/mol, also der 2,15,16-Trihydroxyhexadekansäure mit sechs C-Atomen enthaltenen Acetyldekoration, zugeordnet werden. Die Masse 820 g/mol kann der Ustilaginsäure mit 15,16-Dihydroxyhexadekansäure und acht C-Atome enthaltenen Seitengruppe $+\text{Na}^+$ zugeordnet werden. Und die Ustilaginsäure mit 2,15,16-Trihydroxyhexadekansäure und acht C-Atome enthaltenen Alkyldekoration hat zusammen mit dem Gegenion Na^+ die Masse 836 g/mol. In der gereinigten Ustilaginsäure konnte also auch durch Massenspektrometrie alle vier Ustilaginsäure-Variationen nachgewiesen werden.

2.2 Reinigung einer an der Synthese der Ustilaginsäure beteiligten Glukosyltransferase

Um ein Schlüsselenzym des Ustilaginsäure-Stoffwechsels zu identifizieren, sollte versucht werden einen biochemischen Assay für einen Syntheseschritt der Ustilaginsäure zu etablieren. Eine Besonderheit der Ustilaginsäure ist die ungewöhnliche Fettsäure des Lipidanteils. Dabei handelt es sich um 15,16 Di- oder 2,15,16 Trihydroxyhexadekansäure, die auch als Ustilinsäure A bzw. B bezeichnet werden. Aus Vergleichen mit anderen Glykolipiden wurde angenommen, dass es ein Enzym gibt, das spezifisch die Ustilinsäure erkennt und die glukosidische Bindung mit dem Glukoseanteil herstellt. Solche Enzyme, die den Transfer von Zuckereinheiten von einem aktivierten Donormolekül auf ein spezifisches Akzeptor-Molekül katalysieren und somit eine glykosidische Bindung herstellen, werden Glykosyltransferasen genannt (Campbell *et al.*, 1997). Ist der an der Reaktion beteiligte Zuckeranteil bekannt, so wird der Name des Enzyms dahingehend verändert, wie z.B. bei Mannosyl- oder Glukosyltransferasen. Da die Glykosylierungsreaktionen in der Regel hochspezifisch in Bezug auf die Konformation des Zuckeranteils und der Glykosylierungsstelle sind, wurde geschlossen, dass die Erkennungs- und Nukleotid-Zucker-Bindungs-Stelle in hochspezifischen Domänen der Enzyme vorliegen (Kapitonov and Yu, 1999).

Während viele Glykosyltransferasen bekannt sind, die Zuckerreste auf Proteine, Polysaccharide oder Zuckerreste übertragen, sind nur wenige Transferasen bekannt, die Zucker auf Lipidmoleküle übertragen. In Pilzen ist bisher eine einzige Glykosyltransferasereaktion teilweise biochemisch charakterisiert worden, die zur Produktion eines Glykolipids führt. Es handelt sich hierbei um die Bildung eines Sophorose-Lipids in *Candida bogoriensis*. An dieser Reaktion sind zwei Glukosyltransferasen beteiligt. Die eine ist eine UDP-Glukose:13-hydroxydocosanoic acid Glukosyltransferase und die andere eine UDP-glucose:13-glucosyloxydocosanoic-acid-glucosyltransferase. Mit Hilfe eines Enzymassays konnten diese beiden Glukosyltransferasen teilweise gereinigt werden (Breithaupt and Light, 1982; Esders and Light, 1972). Diese Glukosyltransferasen sind spezifisch für ihre Substrate UDP-Glukose und 13-Hydroxydocosanoic acid (HDA) bzw. dem Produkt der ersten Glukosyltransferasereaktion, dem 13-sophorosyl-oxydocosanoic acid (GlcHDA). Zur Messung der Enzymaktivität wurde die UDP-Glukose radioaktiv markiert und der Einbau der hydrophilen Glukose in das Glykolipid durch Extraktion mit einem organischen Lösungsmitteln, wie z.B. Ether/Ethylacetat, bestimmt. Das HDA als Ausgangssubstanz wurde durch eine hydrolytische Spaltung des Endproduktes Hydroxydocosanoic acid sophoroside gewonnen.

Es wurde versucht den Enzymassay von Breithaupt einzusetzen, um die an der Ustilaginsäure-Produktion beteiligte Enzymaktivität zu bestimmen. Hierfür sollte idealerweise die Ustilinsäure (UI), der Lipidanteil der Ustilaginsäure und die vermutete

Ausgangssubstanz, als spezifisches Substrat eingesetzt werden. Die Ustilinsäure-abhängige Glukosyltransferaseaktivität sollte mit Hilfe der radioaktiv markierten UDP-Glukose verfolgt bzw. nachgewiesen werden.

Zuerst aber mussten die Substrate zur Verfügung stehen. 15,16-Dihydroxyhexadekansäure bzw. 2,15,16-Trihydroxyhexadekansäure ist nicht kommerziell erhältlich und musste deshalb aus dem Glykolipid gewonnen werden.

2.2.1 Herstellung von Ustilinsäure als Akzeptorlipid

Ustilinsäure kann durch Spaltung der glukosidischen Bindung zwischen dem Zuckeranteil und dem Lipidanteil der Ustilaginsäure erzeugt werden.

Um diese glykosidische Bindung zwischen dem Zucker- und Lipidanteil der Ustilaginsäure zu spalten, wurde eine saure Methanolyse durchgeführt (Morrison, 1986). Das Protokoll wurde dahingehend verändert, dass sie im Eppendorfreaktionsgefäß durchgeführt werden konnte. Da es sich bei der Ustilinsäure um eine gesättigte Fettsäure handelt, war es nicht nötig, die Reaktion unter Sauerstoffausschluß durchzuführen. 2 mg Ustilaginsäure wurde in einem Eppendorf-Gefäß mit 1 ml HCl:Methanol:H₂O-Gemisch (3:29:4) für 16 h bei 78 °C inkubiert. Nachdem die Ustilinsäure durch das saure Methanol vom Zuckeranteil der Ustilaginsäure abgespalten war, wurde sie in Petrolether gelöst. Petrolether ist ein so hydrophobes organisches Lösungsmittel, dass sich Ustilaginsäure nicht, die Fettsäure Ustilinsäure jedoch gut darin löst.

Zur Überprüfung wurde das erhaltene Produkt mit Hilfe einer HPLC-MS (High Performance Liquid Chromatographie-Massenspektrometrie) massenspektrometrisch analysiert. Hierbei dienten die 16-Hydroxyhexadekansäure, und 1,2-Hexadekandiol, als Referenz. Die Messungen wurden im Laboratorium von Professor Marahiel, FB Chemie der Universität Marburg, durchgeführt.

Im Chromatogramm konnten beide erwarteten Varianten der Ustilinsäure nachgewiesen werden. Sowohl die 15,16-Dihydroxyhexadekansäure (UI-A) mit der Masse 287 g/mol, als auch die 2,15,16-Trihydroxyhexadekansäure (UI-B) mit der Masse 303 g/mol konnten identifiziert werden. Die Referenz Junipersäure (16-Hydroxyhexadekansäure) konnte mit der Masse von 271 g/mol ebenfalls nachgewiesen werden. Bei der Masse 285 g/mol handelt es sich um das Laktam der 2,15,16-Trihydroxyhexadekansäure und bei der Masse 269 g/mol handelt es sich um das Laktam der 15,16-Dihydroxyhexadekansäure. Welche der endständigen Hydroxylgruppen dabei den Lactamring mit der Säuregruppe der Ustilinsäure gebildet hat, ist durch die alleinige Massenbestimmung nicht zu bestimmen. Inwieweit diese Laktambildung die Aktivität der Ustilinsäure abhängigen Glukosyltransferase beeinflusst, oder ob sie sogar in dieser Form als Substrat für die Reaktion benötigt wird, konnte nicht geklärt werden.

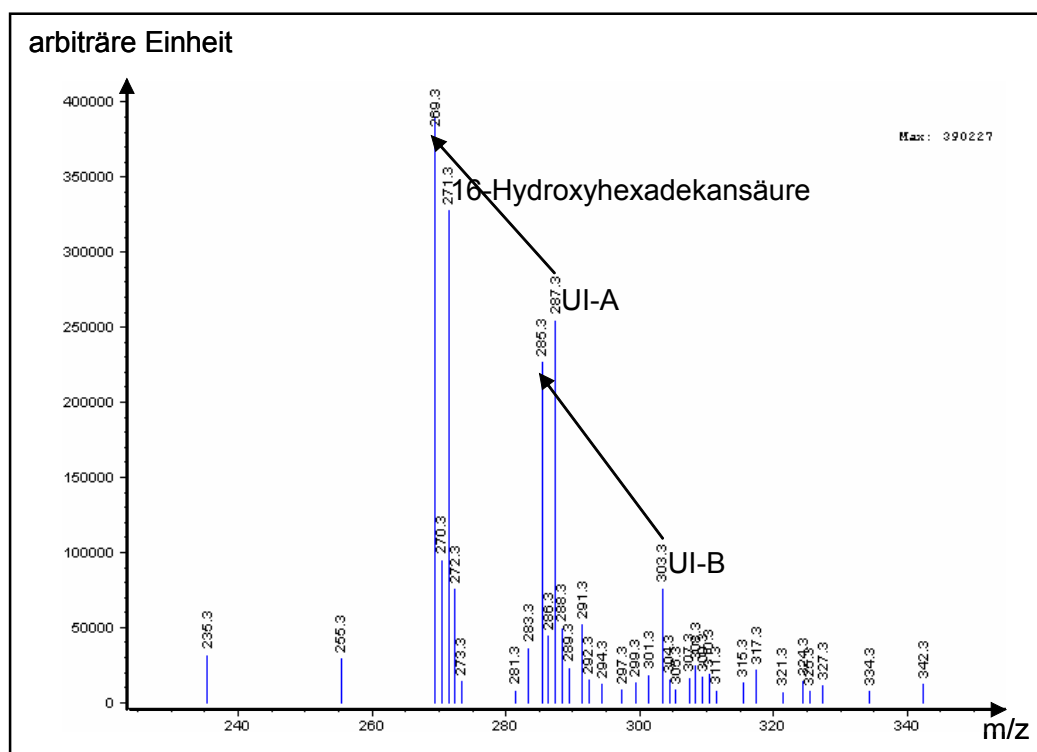


Abbildung 7: Massenspektrometrische Analyse der Ustilinsäure A und B. Die Ustilinsäure wurde für die Messung in Methanol gelöst. Es konnten sowohl die 15,16-Dihydroxyhexadekansäure (UI-A) mit der Masse 287 g/mol als auch die 2,15,16-Trihydroxyhexadekansäure (UI-B) mit der Masse 303 g/mol identifiziert werden. Als Referenz wurde 16-Hydroxyhexadekansäure mit der Masse von 271 g/mol verwendet. Die Masse 285 g/mol wurde dem Laktam der 15,16-Dihydroxyhexadekansäure und die Masse 269 g/mol wurde dem Laktam der 2,15,16-Trihydroxyhexadekansäure zugeordnet (mit Pfeilen gekennzeichnet).

Die Abspaltung der Fettsäure von dem Zuckeranteil der Ustilaginsäure und somit die Herstellung der Ustilinsäure konnte also anhand ihrer Masse bestätigt werden. Für den Einsatz im Enzymassay, wurde sie in Methanol gelöst.

2.2.2 Glukosyltransferasetest

Als Enzymassay wurde der von Breithaupt beschriebene Glukosyltransferase-Assay modifiziert (Breithaupt and Light, 1982). Als spezifisches Akzeptormolekül wurde ein Gemisch aus Ustilinsäure A + B verwendet. Wird nun die radioaktiv markierte UDP-Glukose auf die Ustilinsäure übertragen, kann diese Reaktion durch Extraktion des radioaktiven Reaktionsprodukts mit Ether/Ethylacetat verfolgt werden. Hierzu wurde die organische Ether/Ethylacetat-Phase abgenommen, mit Szintillationsflüssigkeit versetzt und der ^{14}C -Gehalt im Szintillationszähler bestimmt.

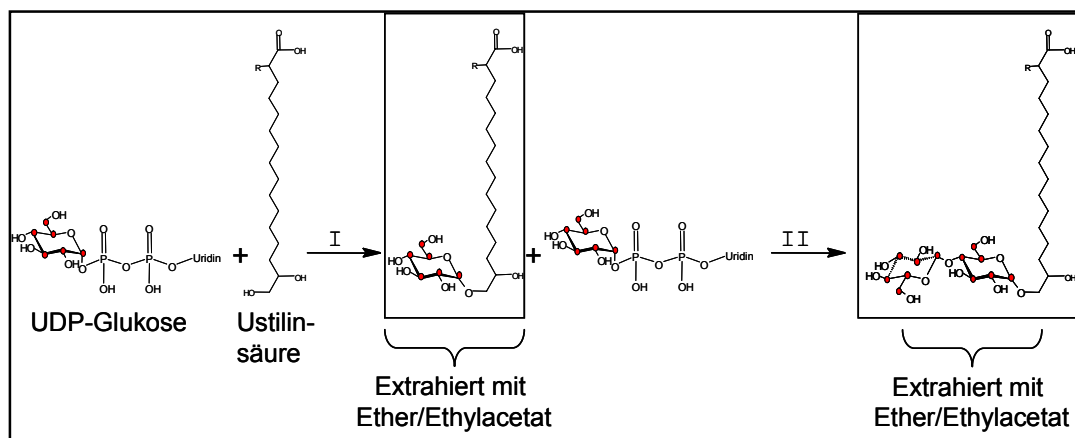


Abbildung 8: Skizze des Enzymassays: Reaktion der Ustilinsäure mit UDP-Glukose unter Katalyse einer Ustilinsäure abhängigen Glukosyltransferase (I) und Glukosyltransferase (II) nach (Breithaupt and Light, 1982). Die UDP-Glukose ist an ihren Kohlenstoffatomen radioaktiv mit ^{14}C markiert (rote Kreise).

2.2.3 Enzymreinigung

Zur Reinigung der Ustilinsäure-abhängigen-Glukosyltransferase wurde der Stamm MB215 in dem Stickstoffmangelmedium YNB mit 5% Glukose bei 28°C und 180 rpm angezogen, da unter diesen Bedingungen eine starke Ustilaginsäure-Produktion zu beobachten ist (siehe Kapitel 2.1). Der Aufschluss der Zellen erfolgte nach 24 h Inkubation bei einer OD_{600} von ca. 1,0 bis 1,5 mit Hilfe der French-Press. Andere Methoden, wie z.B. der Aufbruch der Zellen durch Protoplastierung, könnten durch Verwendung eines lytischen Enzyms die Aktivität der Glukosyltransferase beeinträchtigen und wurden deshalb nicht eingesetzt.

Der aus der French-Press erhaltene Rohextrakt der Ustilaginsäure-produzierenden Zellen zeigte Ustilinsäure-abhängige Glukosyltransferase-Aktivität. Die nachgewiesene Glukosyltransferase-Aktivität ist in dpm/ μl angegeben. Das Ausgangsvolumen der Proben beträgt 10 ml. Ab einem Wert von 0,5 dpm/ μl wurde die Probe als positiv gewertet.

Während in dem Enzymassay des Rohextrakts mit Ustilinsäure (UI) als Fettsäure eine Aktivität von 5,27 dpm/ μl nachgewiesen werden konnte, wurde in der Kontrolle ohne UI keine Aktivität (0,19 dpm/ μl) gemessen. Durch Zentrifugation bei 10.000 g wurden Zelltrümmer abzentrifugiert. Im Überstand befand sich jetzt noch cytosolische- und membrangebundene-Zellbestandteile. Die Hauptaktivität befand sich nach der Zentrifugation im Überstand (8,26 dpm/ μl), im Pellet wurde aber noch eine Aktivität von 2,82 dpm/ μl nachgewiesen. Um die cytosolischen- von den membrangebundenen Proteinen zu trennen, wurde eine 100.000g-Zentrifugation durchgeführt. Danach befinden sich die cytosolischen Proteine im Überstand und die membrangebundenen Proteine im Pellet. Die membrangebundenen Proteine wurden mit schwachen, nicht ionischen Detergentien aus der Membran gelöst. Dazu wurden verschiedene Detergentien als Solubilisierungsmittel getestet,

das Membranpellet wurde in Puffer mit 1% des Detergens aufgenommen und 1 h bei 4°C durch Schütteln solubilisiert. Als Lösungsmittel wurde TritonX-100, CHAPS und Dodecylmaltosid getestet (Daten nicht gezeigt). TritonX-100 stellte sich als gutes Lösungsmittel zum Herauslösen der Ustilinsäure-abhängigen Glukosyltransferase aus der Membranfraktion raus. Die Glukosyltransferase-Aktivität war aber nur wenig stabil. Auch mit den anderen Lösungsmitteln wurde ein starker Verlust der Glukosyltransferase-Aktivität innerhalb von kurzer Zeit beobachtet.

Im Überstand der 100.000 g Zentrifugation konnte nur eine Aktivität von 1,13 dpm/μl nachgewiesen werden. Im Pellet, das zuvor 1 h bei 4°C in Puffer mit 1% TritonX-100 gelöst wurde, wurde dagegen eine Aktivität von 3,70 dpm/μl gemessen. Die Kontrollen ohne UI zeigten keine Aktivität (das 100.000g ÜS zeigte 0,34 dpm/μl, das 100.000g Pellet zeigte 0,38 dpm/μl).

Um zu kontrollieren, ob die eingesetzte UI alleine, ohne Protein Glukosyltransferase-Aktivität hat, wurde der Enzymassay nur mit UI ohne Protein durchgeführt. Die UI zeigte mit 0,38 dpm/μl keine Glukosyltransferase-Aktivität.

Aus diesen Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass sich der Hauptbestandteil der Ustilinsäure-abhängige Glukosyltransferase-Aktivität im Membranpellet befand. Viele Glukosyltransferasen enthalten Domänen, die mit Membran-gekoppelten Prozessen assoziiert sind. Hierzu zählt die Pleckstrin-Homologie-(PH-) Domäne und die FYVE-Domäne (Doerks *et al.*, 2000).

Betrachtet man die Aktivitäten der einzelnen Reinigungsschritte und vergleicht sie mit dem vorhergehenden Schritt, wie z.B. der vorhergehenden Zentrifugation, so ist ein starker Verlust der Aktivität ersichtlich. Man findet z.B. im 10.000g-Überstand noch eine Aktivität von 8,26 dpm/μl, aber im 100.000g-Pellet und Überstand zusammen nur noch 4,83 dpm/μl. Das ist innerhalb eines Zentrifugationsschrittes ein Verlust von 42% Aktivität (vgl. Abb.5).

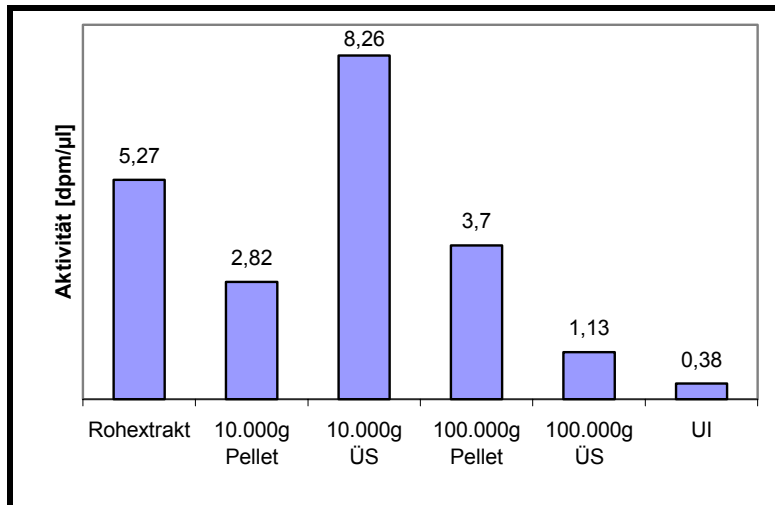


Abbildung 9: Eine Ustilinsäure-abhängige UDP-Glukosyltransferase konnte im 100.000g Pellet von *U. maydis* nachgewiesen werden. Es wurde Rohextrakt (20 ml), 10.000g Überstand (18 ml) und Pellet (2 ml) sowie 100.000g Überstand (18 ml) und Pellet (2 ml), dass in 1% TritonX-100 gelöst wurde, gemessen. Die Messung wurde zur Kontrolle jeweils auch ohne das Akzeptorlipid UI durchgeführt.

Das erste Ergebnis dieser Enzymmessungen war, dass es Ustilinsäure-abhängige Glukosyltransferaseaktivität in dem Zellaufschluss von *U. maydis* Zellen nachgewiesen werden konnte. Ein weiteres Ergebnis war, dass diese Ustilinsäure-abhängige Glukosyltransferaseaktivität in der Membranfraktion der Zellen nachgewiesen werden konnte. Mit den aus der Membran gelösten Proteinen wurden weitere Reinigungsschritte durchgeführt. Dazu wurde versucht die Enzymaktivität durch eine Ammoniumsulfat-Fällung, eine Anionen-Austausch Chromatographie, eine Affinitätschromatographie und eine Gelfiltration anzureichern.

Ammoniumsulfat-Fällung

Eine schonende Methode zur Anreicherung von Proteinen ist die fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat. Ein Problem dieser Fällungsmethode ist die Resolubilisierung gefällter Membranproteine. Hierzu wurde 1% TritonX-100 verwendet, das in den nachfolgenden Reinigungsschritten entfernt werden konnte.

Ausgehend von einer Ustilinsäure-abhängigen Glukosyltransferase-Aktivität aus dem 100.000g Pellet-Extrakt von 54,00 dpm/μl wurde die Ammoniumsulfat-Fällung durchgeführt. Das Maximum der Glukosyltransferase-Aktivität konnte zuerst zwischen den Ammoniumsulfatsättigungen von 40-60 % nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Bei 30% AS-Fällung konnte eine Aktivität von 16,00 dpm/μl im Überstand nachgewiesen werden. Der AS-Gehalt des 30% AS-Überstand wurde auf 50% AS erhöht. 70% (6,10 dpm/μl) der Ustilinsäure-abhängigen Glukosyltransferase-Aktivität aus der 50% AS-Fällung wurde im

Überstand nachgewiesen, 30% (2,66 dpm/ μ l) der Aktivität wurde im Pellet gemessen. Um zu kontrollieren, ob die gemessene Glukosyltransferase-Aktivität Ustilinsäure-abhängig ist, wurden die Messungen auch ohne UI durchgeführt. Durch diese Kontrolle konnte die UI-Abhängigkeit der gemessenen Glukosyltransferase-Aktivität nachgewiesen werden.

Auch hier ist ein rascher Verlust der Aktivität zu beobachten. So ist zwischen zwei AS-Fällungen ein Verlust von über 46 % der Aktivität zu verzeichnen.

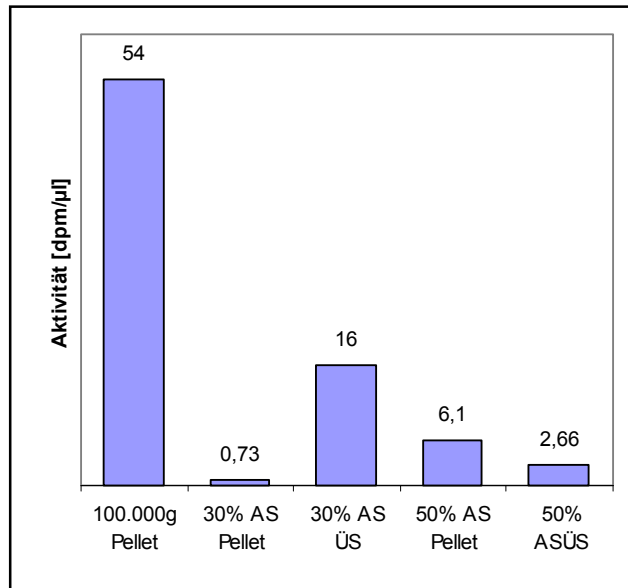


Abbildung 10: Ammoniumsulfat-(AS)-Präzipitation. Bei einer Konzentration von 50% AS befindet sich 60% der Glukosyltransferase-Aktivität im Überstand. Es wurde die Ausgangsaktivität des 100.000g Pellets (20 ml), das 30% AS Pellet (3 ml), der 30% AS Überstand (36 ml) sowie das 50 % AS Pellet (4 ml) und der 50% AS Überstand (51 ml) gemessen. Die Messung wurde zur Kontrolle auch jeweils ohne das Akzeptorlipid Ustilinsäure durchgeführt.

Da mit Hilfe der Ammoniumsulfat-Fällung nur eine geringe Anreicherung möglich ist, wurde versucht zur Reinigung Methoden anzuwenden, die eine höhere Reinigungseffizienz aufweisen. Die Säulenchromatographie stellt eine solche Methode dar, in der Proteine fraktioniert von einem Trägermaterial mit einem Elutionsmittelgradienten gewaschen werden.

Anionen-Austausch Chromatographie

Ionen-Austausch-Chromatographie trennt Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Ladung. Die Auftrennung beruht auf der reversiblen Interaktion geladener Proteine mit der entgegengesetzt geladenen Matrix. Proteine binden unter Niedersalzs-Bedingungen an die Matrix und werden durch den Aufbau eines Ionengradienten ihrer Ladung entsprechend eluiert. Der Vorteil des Ionen-Austauschers ist ein unlimitiertes Ladevolumen, eine hohe Ladekapazität, gute Auftrennungseffizienz und die Geschwindigkeit dieses Verfahrens. Die Reinigung erfolgte durch FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography) an einer DEAE-Anionenaustauschsäule.

Die Bindung der Proteine erfolgt bei einer Salzkonzentration von 50 mM NaCl. Anschliessend wurden die Proteine mit einem NaCl-Gradienten von 0-400 mM NaCl eluiert. Das Elutionsprofil der Proteine wurde über photometrische Messungen bei OD₂₈₀ nach der Elution von der Säule gemessen (Abb.7). Die erhaltenen Fraktionen wurden im Enzymassay getestet. Die höchste Ustilinsäure-abhängige Glukosyltransferaseaktivität wurde von der DEAE-Säule in den Fraktionen 9-13 bei einer Konzentration von 200 mM NaCl eluiert.

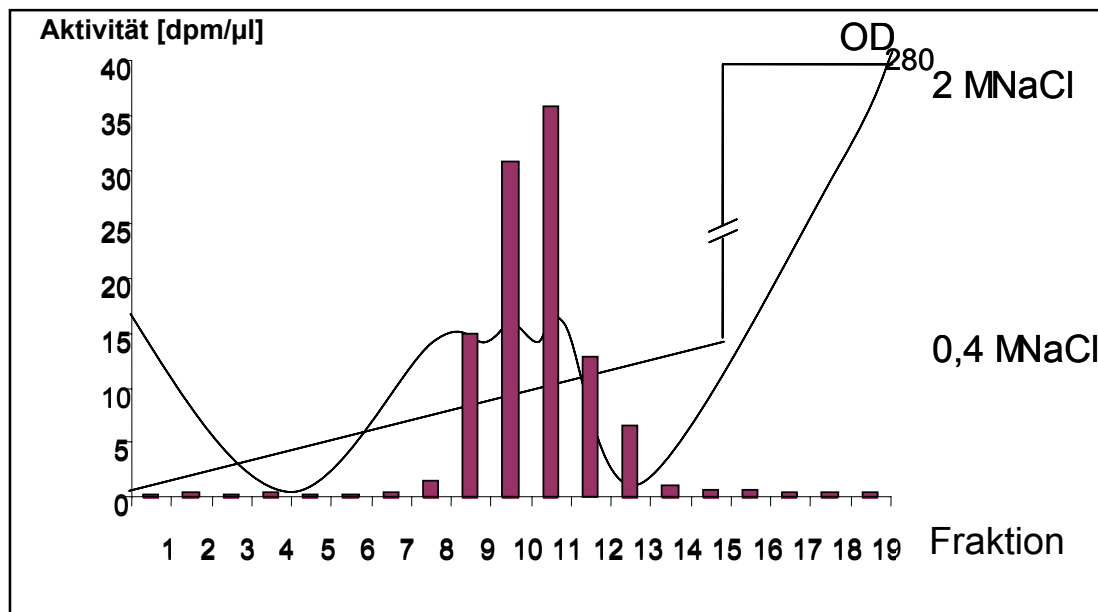


Abbildung 11: Aktivität der DEAE-Fraktionen. Die Messungen beziehen sich auf 3 ml Volumen der eluierten Fraktionen (1-19).

Die eluierten Fraktionen wurden auf einem SDS-Proteingel überprüft. Um auch geringe Proteinmengen nachweisen zu können, wurde eine Silberfärbung vorgenommen, die im Vergleich zu einer Coomassie-Färbung Proteine 40 mal sensibler anfärbt (Sambrook *et al.*, 1989). Ausgehend von der Reinigung der Sophorosid-produzierenden Glukosyltransferasen wurde erwartet, dass es sich um ein Protein mit der Größe von > 50 kDa handelt (Breithaupt and Light, 1982).

Da in jeder der analysierten Fraktionen eine Vielzahl von verschiedenen großen Proteinbanden vorhanden war, konnte keine eindeutige Zuordnung der Glukosyltransferaseaktivität zu einer Proteinbande getroffen werden. Die Ustilinsäure-abhängigen Glukosyltransferase konnte mit diesem Schritt jedoch stark ankonzentriert werden.

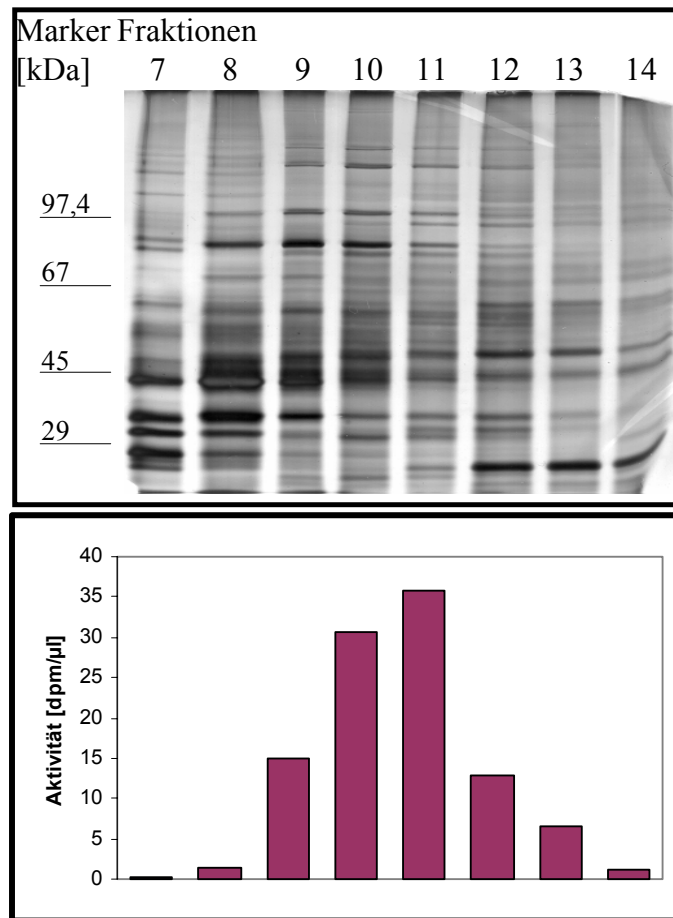


Abbildung 12: Silber gefärbtes, 10% iges SDS-Polyacrylamid-Gel der DEAE-Fractionen 7 - 14. Es wurden je 10 µl der Fraktionen aufgetrennt. Die in den Fraktionen 7-14 gemessenen Ustilinsäure-abhängigen Glukosyltransferase-Aktivitäten wurden im unteren Teil der Abbildung erneut dargestellt und dienen zum Vergleich der Stärke der Proteinbanden mit den Proteinaktivitäten.

Eine weitere Anreicherung der Glukosyltransferase aus den Proteinfractionen 9 – 13 gelang nicht, da Glukosyltransferase-Aktivität sehr schnell nachließ (Daten nicht gezeigt). Um weitere Reinigungsmethoden zu testen, wurde deshalb ausgehend von dem 100.000 g Pellet eine Gelfiltration und eine Affinitätschromatographie durchgeführt.

Gelfiltration

Mit Hilfe einer Gelfiltration sollten die aus dem 100.000 g Pellet eluierten Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Bei der Gelfiltration muss die Probe möglichst konzentriert aufgetragen werden, um auch einen möglichst kleinen Elutionsbereich zu erhalten. Ein Nachteil der Gelfiltration ist die benötigte Zeit und der hohe Verdünnungsfaktor.

Es wurden 2,3 ml konzentrierte Probe aufgetragen. Die Auftrennung der Probe dauerte 3 h und dabei wurde sie ca. 3fach verdünnt. Die Gelfiltration wurde im Labor von U. Völker (FB

Biologie, Uni Marburg) durchgeführt. In den Fraktionen der Gelfiltration konnte keine Ustilinsäure-abhängige UDP-Glukosyltransferase-Aktivität mehr nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), was sowohl mit der hohen Verdünnung als auch der langen Verweildauer auf der Säule zusammenhängen könnte.

Affinitätschromatographie

Eine weitere sehr effektive Reinigungsmethode ist die Reinigung über Affinitätschromatographie. Hierbei wird das Protein spezifisch und reversibel an einen Liganden gebunden. Bei der Reinigung der Glukosyltransferasen aus *C. bogoriensis* konnte gezeigt werden, dass die UDP-Glukose-abhängige Glukosyltransferase an Blue-2-Agarose bindet (Breithaupt and Light, 1982) und mit UDP-Glukose wieder eluiert werden konnte. Deshalb wurde das Säulenmaterial Blue-Sepharose zur Reinigung der Ustilinsäure-abhängigen UDP-Glukosyltransferase ausgewählt, an das Nukleotid-abhängige Enzyme binden. Die resolubilisierten 100.000 g Proteine wurden an das Material im „batch“-Verfahren gebunden und in einzelnen Elutionsschritten mit dem Antagonisten UDP-Glukose eluiert. Bei einer Konzentration von 20 mM UDP-Glukose wurde die Ustilinsäure-abhängige UDP-Glukosyltransferase von der Blue-Sepharose gelöst und konnte im Überstand nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Zusammengefaßt standen als Reinigungsschritte der aus dem 100.000g-Pellet eluierten Ustilinsäure-abhängigen UDP-Glukosyltransferase also die Ammoniumsulfat-(AS)-Fällung, die Anionen-Austausch-Chromatographie mit DEAE als schwachen Anionen-Austauscher und die Affinitätschromatographie mit Blue-Sepharose als Nukleotid-Austauscher zur Verfügung. Es gelang jedoch nicht die Aufreinigung der Glukosyltransferase durch aufeinander folgende Reinigungsschritte zu verbessern. Wurde nach der DEAE-Chromatographie eine AS-Fällung durchgeführt oder nach der AS-Fällung die DEAE-Chromatographie, so konnte keine Ustilinsäure-abhängige UDP-Glukosyltransferase-Aktivität mehr detektiert werden. Das gleiche galt auch für die Blue-Sepharose-Chromatographie und die AS-Fällung oder DEAE-Chromatographie.

Aus diesen und den vorhergehenden Beobachtungen wurde geschlossen, dass die Ustilinsäure-abhängige UDP-Glukosyltransferase anscheinend sehr empfindlich ist. Die Aktivität nimmt so rasch ab, dass mehrere Reinigungsschritte oder auch langwierigere Reinigungsansätze, wie die Gelfiltration, nicht möglich sind. Im zeitlichen Rahmen der Doktorarbeit gelang es nicht, ein aktivitätserhaltendes Aufreinigungsverfahren zu entwickeln. Aus diesem Grund sollte versucht werden, über DNA-Sequenzhomologien mit anderer Glukosyltransferasen potentielle an der Ustilaginsäure-Biosynthese beteiligte Glukosyltransferasen aus *U. maydis* zu isolieren.

2.3 Identifizierung von Glukosyltransferasen aus *U. maydis*

2.3.1 Isolierung von Glykosyltransferasen aus *U. maydis* mit Hilfe eines PCR-gestützten Ansatzes

Um Glukosyltransferasen in *U. maydis* zu identifizieren, wurde ein PCR-gestützter Ansatz ausgewählt. Hierzu wurden Primer ausgewählt die von konservierten Domänen in Glukosyltransferasen abgeleitet wurden. Dabei wurde besonders beachtet, dass das Substrat der gesuchten Glukosyltransferasen ein Lipid ist und dass es sich bei dem übertragenen Zuckerrest um Glukose handelt. Dabei wurden besonders solche Ausgangsorganismen für die Vergleichs-DNA-Sequenzen bevorzugt, die Glukosyltransferasen aus Pilzen oder Hefen kodieren und deshalb am besten geeignet schienen, um degenerierte Primer abzuleiten.

Zur Herleitung von Glukosyltransferase-Primern diente ein 1999 von Warnecke *et al.* (Warnecke *et al.*, 1999) veröffentlichtes Sequenz-Alignment von UDP-Glukose:Sterolglukosyltransferasen aus *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *P. pastoris* und *D. discoideum*, als Grundlage. Dieses Alignment stellt nicht nur die Sequenzähnlichkeiten der Sterolglukosyltransferasen aus Pilzen im Vergleich zu *Arabidopsis thaliana* und *Avena sativa* heraus, sondern zeigte auch einzelne konservierte Domänen auf. Darunter befinden sich eine Steroid-Bindungsdomäne und eine hochkonservierte UDP-Glukosyltransferase-Domäne. Dies erleichterte die Auswahl des Bereichs, aus dem die Primer generiert wurden (Warnecke *et al.*, 1999).

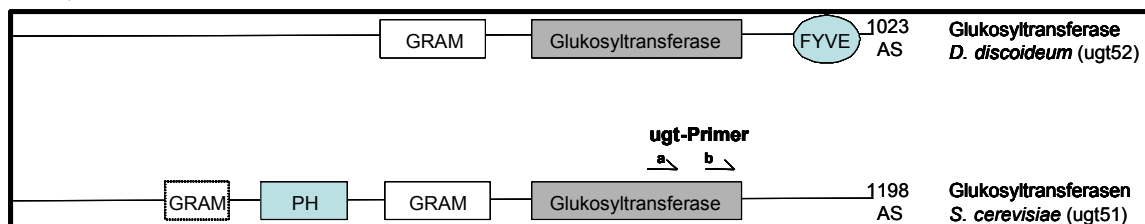


Abbildung 13: Domänen-Architektur der Glukosyltransferasen in Pilzen. Zusätzlich zu den Glukosyltransferase-Domänen wurden mittlerweile weitere Domänen der von D. Warnecke beschriebenen Glukosyltransferasen identifiziert (Doerks *et al.*, 2000). Diese Domänen geben den Hinweis, dass es sich bei diesen Glukosyltransferasen um membranassoziierte Proteine handelt (siehe 2.2 Glukosyltransferase-Reinigung). Es wurden zwei spezifische Primer generiert, die in der konservierten UDP-Glukosyltransferase-Domäne liegen. Abkürzungen der Domänen: FYVE :Zn-Finger Domäne, die PIP3 bindet, Glukosyltransferase: Signatur-Sequenz einer Protein Superfamilie von UDP-Glukosyltransferasen (Campbell *et al.*, 1997); PH: Pleckstrin-Homologie Domäne; GRAM: Glukosyltransferases, Rab-like GTPase activators and myotubularins (Doerks *et al.*, 2000).

Da die konservierten Bereiche nur sehr kurz sind, dafür aber dicht am C-Terminus lokalisiert sind, wurde die Methode der 3' RACE benutzt um mögliche Glykosyltransferase-Transkripte zu amplifizieren. Die 3'RACE erlaubt die schnelle Amplifikation und Identifizierung von cDNA-Sequenzen, bei denen nur der C-Terminus eines Proteins bekannt ist.

2.3.2 Isolierung einer Glukosyltransferase mit Hilfe einer 3'RACE

Um eine erfolgreiche Amplifizierung zu gewährleisten, wurde die RNA aus Zellen isoliert, die 6, 12 und 24h in YNB mit 5% Glukose unter Stickstoffmangelbedingungen inkubiert wurden und eine starke Ustilaginsäureproduktion aufwiesen. Als Kontrolle wurde auch RNA aus Zellen gewonnen, die unter gleichen Bedingungen angezogenen wurden, wobei das Medium jedoch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ als Stickstoffquelle enthielt.

Für die 3'RACE wurde zuerst mit Hilfe der reversen Transkription und einem Poly-dT-Primer cDNA aus der mRNA hergestellt. Der Poly-dT-Primer trug zusätzlich noch einen 18-Nukleotid-Adapter. Dieser Adapter-Primer wurde in der nachfolgenden PCR eingesetzt. Als spezifische Glukosyltransferase-Primer wurde der aus den pilzlichen Glukosyltransferasen abgeleitete Primer eingesetzt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel aufgetrennt, prominente Banden isoliert und kloniert.

Als Ausgangsmaterial wurde in diese Reaktion sowohl RNA aus Ustilaginsäure-produzierenden als auch aus Nicht-Ustilaginsäure-produzierenden Zellen eingesetzt. Die PCR-Produkte, die nur unter Ustilaginsäure-produzierenden Bedingungen amplifiziert wurden, fanden besondere Beachtung. Insgesamt wurden 14 klonierte PCR-Produkte sequenziert und die Sequenzen mit Hilfe des Programms BLAST mit der Genbank (Altschul *et al.*, 1997) verglichen. Fünf PCR-Produkte zeigten Ähnlichkeit zu Proteinen, die an einer Glykosyltransferase-Reaktion beteiligt sind. So konnte eine 8-Amino 7-Oxononanoat Synthase, die am Biotin-Synthese-Weg beteiligt ist, und eine γ -Untereinheit des Oligosaccharid-Transferaseglycoproteins gefunden werden. Diese alle sind an einem bereits bekannten Syntheseweg beteiligt und wurden nicht weiter verfolgt. Eine potentielle Cellulose-Synthase, die möglicherweise die zweite Glukosyltransferase-Reaktion zwischen den beiden Zuckereinheiten katalysieren könnte, wurde ebenfalls identifiziert. Sie wurde jedoch sowohl unter Ustilaginsäure-produzierenden als auch unter Nicht-Ustilaginsäure-produzierenden Bedingungen amplifiziert.

Die einzige Glukosyltransferase, die verstärkt aus Ustilaginsäure-produzierenden Zellen amplifiziert wurde, zeigte hohe Ähnlichkeit zu einer UDP-Glukose:Sterolglukosyltransferase aus *S. cerevisiae* und *C. albicans*.

Da die UDP-Glukose-Sterolglukosyltransferase zu der großen Familie der UDP-Glukose-abhängigen Glycosyltransferasen gehört, wurde die aus *U. maydis* identifizierte UDP-Glukosyltransferase mit Ugt1 bezeichnet. Mit der erhaltenen Sequenz bzw. dem klonierten Teilstück des Gens konnte nach der vollständigen Sequenz gesucht werden bzw. das Gen der Glukosyltransferase isoliert werden.

2.3.3 Klonierung und Sequenzierung des *ugt1*-Gens

Zur Isolierung der vollständigen potentiellen UDP-Glukose-Glukosyltransferase-Sequenz wurde eine genomische *U. maydis* Cosmidbank (Bölker *et al.*, 1995) mit dem radioaktiv markiertem 700 bp PCR-Produkt durchgemustert. Dazu wurde die 700 bp Bande kloniert und aus dem Plasmid pBS KJ 1 als Sonde isoliert. Auf diese Weise wurde der Cosmidklon 2 G6 und 41 F4 identifiziert und im Anschluss über Restriktionsanalysen kartiert. Ein 5,4 kb großes Fragment wurde für nachfolgende Sequenzanalysen in verschiedene Subklone unterteilt. Die Auswertung der Sequenzanalyse des 5,4 kb Fragments ergab einen offenen Leserahmen von 4656 bp, in dessen abgeleiteter Proteinsequenz die konservierten Bereiche der Sterolglukosyltransferasen, aus denen die RACE-Primer generiert wurden, wiedergefunden wurden. Die Aminosäure- und Nukleotidsequenz der UDP-Glukose-Sterolglykosyltransferase *ugt1* aus *U. maydis* befindet sich im Anhang.

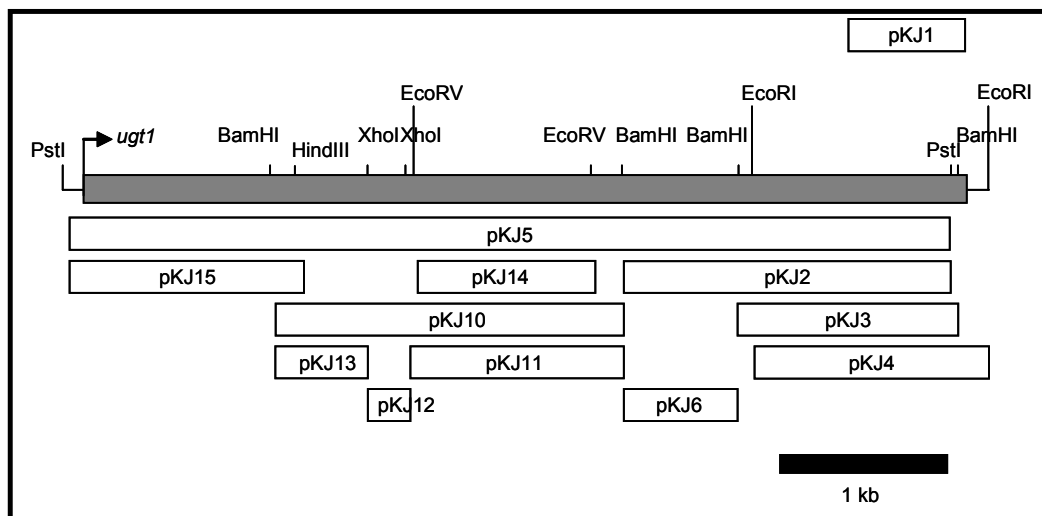


Abbildung 14: Kartierung von *ugt1*: Die Fragmente 1,4 kb EcoRI (pKJ4), 1,3 kb BamHI (pKJ3) und 3,3 kb PstI (pKJ2) Fragmente aus dem Cosmid 2-1 G6 und ein 5,2 kb PstI (pKJ5) Fragments aus dem Cosmid 41 F4 wurden vollständig sequenziert. Die hergestellten Subklone sind skizziert. Die bei der Kartierung verwendeten Restriktionsschnittstellen sind angegeben. Ein 1 kb Standard ist eingezeichnet. Als Sonde zur Isolierung von *ugt1* aus der Cosmidbank diente das in pKJ1 klonierte RACE-Amplifikat.

Das Ugt1-Protein besitzt Ähnlichkeiten mit Ugt51 aus *C. albicans*, *S. cerevisiae* und anderen Sterolglukosyltransferasen

Ein Vergleich der Ugt1 Sequenz mit der Genbank ergab die größte Ähnlichkeiten zu Sterolglukosyltransferasen, insbesondere zu denen aus anderen Pilzen und Hefen (Warnecke *et al.*, 1999).

Innerhalb der Proteinsequenz konnten die für Glukosyltransferasen aus Hefen bereits beschriebenen konservierten Domänen identifiziert werden. Die Aufteilung der Domänen liegt in der gleichen Reihenfolge wie bei Hefen vor (

).

Im C-terminalen Teil liegt eine UDP-Glukosyltransferase-Domäne. Es handelt sich hierbei um die UDPGT-Domäne (UDP-glucuronosyl and UDP-glucosyltransferase-Domain). Nach den Daten der konservierten Domänen-Suche des Programms Blast2 (Altschul *et al.*, 1990) handelt es sich bei der isolierten und sequenzierten Glykosyltransferase um eine membrangebundene Glukosyltransferase (Doerks *et al.*, 2000). Um herauszufinden, ob die identifizierte Glukosyltransferase an der Ustilaginsäure-Biosynthese beteiligt ist, wurden *ugt1*-Deletionsstämme hergestellt. Diese wurden mit Hilfe der homologen Rekombination in *U. maydis* erzeugt.

Ca-Ugt51	1	MSFYKKVTRGLATPLQGSINLFSGSPNVISGDEGTDADNEINPEHRTTYHSLSGRVNHDDDD
Sc-Ugt51	1	MAITISSQSRITDSPEESAKEPSTDSASASQPAAGLGRINVDDKHDDACMLSQASDNIDT
Um-Ugt1	1	MAITISSQSRITDSPEESAKEPSTDSASASQPAAGLGRINVDDKHDDACMLSQASDNIDT
Ca-Ugt51	61	EDVAKLEDITVGFFTGLNITTTVCAGLGSLNNLKHHYLDDEFIKKSALNIP---LRPONYGP
Sc-Ugt51	61	PEPFTSPRLDPWSPRDYSTISSLAGSREGRPAMEPTTKTFTASSLIPESQSKASMSVTP
Um-Ugt1	60	PEPFTSPRLDPWSPRDYSTISSLAGSREGRPAMEPTTKTFTASSLIPESQSKASMSVTP
Ca-Ugt51	117	ETSSSKLNN-----NSIEELTNNGDTSLEKVRKMSLYDFDEHTSDSEEDSADFEE-
Sc-Ugt51	25	DKPLSEPET-----SPRHHRLSRSLSKFKRWGRSINSSLSMGSS--LEQQLQDSPI-
Um-Ugt1	120	HAAAATQSGGLDLVQADVADVAFAEPQGLMQMLSILVIGSTFFDADTEGYTEDDDVEDSLDPT
Ca-Ugt51	166	-----EESIAENLKP-----
Sc-Ugt51	72	-----NEIARSDDEN-----
Um-Ugt1	180	HPLPTSPLITNTHYKPEVHCSISEQDRQTPERSTKGRRLRALRDDLSLEDGSTPQGSRSPL
Ca-Ugt51	176	-----GKLSGKALNHPRDSRTTATITTTOTTR-----TATATITATPTPT
Sc-Ugt51	82	-----GYNDNADDLAKSKYMKKSJAGLITTAIS-----VYAGMNNAQEMN
Um-Ugt1	240	DASVLTIGPSRAKRTSLTQSDIITAPSWDSTITRATIRRPTHRLRSQ LHHVASLASMSLASTSKL
Ca-Ugt51	216	PTSSIVDTD---IVTDVIEPIGK-VITEIPEEQLOGGLNPLQKSVVKNLDPPHHVREGVLIKVK
Sc-Ugt51	122	PLSLQVDS---ESDSSDSFOENIGRNEVSKSKENLTKTKSHPEVPLD---KAKPTLDFDS
Um-Ugt1	300	ASRDITLDQDGGGTLTLSISIPDEESTDTPHVPPTQQQSMESSESMPSDADRPTLKWSDPLLR
Ca-Ugt51	272	NSETPLKNDRQELLEKIQRLKIAJDKQRVFDLSDEDTFLCGNYSAWLIKDVLLOGHVLYIT
Sc-Ugt51	176	ITREKLKSDN-----VAKLRORFCLDEQEPFINDFPAWLKDDVLOGHIEFT
Um-Ugt1	360	PYQDAQASDQRHSDVCESDRLRLHLQKLDIEHLDAAEITLLLAQPCWIFRSLLLOGHVLYIT
Ca-Ugt51	332	KDALLYFALELPKRFSLENSSEVLDEDNSSSIVYSGNLGLKSAKYGEVVLNTVILQHRVAV
Sc-Ugt51	223	TKHFLFEAYLPK-----NPRSVKMSGNLIR-----TKLIRSTRLYWCV
Um-Ugt1	420	SLHVCLEFYALPIS-----RDEKTIKTLGLGKIR-----TRRTHLRFSSKHWAIS
Ca-Ugt51	392	LRAETLSIYSSSTNLYFPVVLVTLKIKCLYTIDKEKLNREAISPVNAGTYSPPNGGLSGT
Sc-Ugt51	261	LKNHLESMYTSSTELLYFPVITIDRL-----EVOKIETOKHTLNG-----
Um-Ugt1	459	LKGGKLSWFDSDQDPLYFPGHLDLRVSAIEPSTTNKDRFKVTTPARFTFLTEG-----
Ca-Ugt51	452	ATPRASTLENTASELNSMLSGDSYSPTEQNVETTASTVWFKLVTKKKTYKF-----S
Sc-Ugt51	300	-----SATKTFKLYTIDESTFKF-----N
Um-Ugt1	514	-----EHSRDAWVSALOKETEFRAQNGESVRISIPLETIIN
Ca-Ugt51	504	CDSFSFSAARQWCNNITKLIFOHNNANSNGEVLKIPISKIAEYNKRALFSEEEEEEDRTLDA
Sc-Ugt51	318	ADSELESAKSWVNAALKKEQFAIAQNSNNS-ISLKLPLPNLIEIDDOQPLVINK-----
Um-Ugt1	550	VETTLSIVDGTDMAICITVVDLADGFSIDEEYFHLHTKPSAFISGLNALINQAVRG-SISSL
Ca-Ugt51	564	TMNDIPLNVTIKYLGIDNDNERKROKLRKYKGEETITIEVHFIFPK-SGVEFFETFDKLV
Sc-Ugt51	367	---[A]LTLRLALESSI---QTYALDDDEMEVEMDGSQVKESLGEOL
Um-Ugt1	609	QGGDQAISLSRSLTHDSTSAMHAAATISERKSLLEVIVPLAKVRVSTQDKIRAHPTAVNKITV
Ca-Ugt51	623	NPVVLNDNQSSK---SSITSTNFSEKAIISTLSKSPNHLYQTVLDFNKPVDDDDISAFKKFG
Sc-Ugt51	407	AILQKSGVW---PATVEQKNNGEDS
Um-Ugt1	669	ATQSTRGSSDRODELDKATSTATVAVPVSIRKRSQEVLSADAAALSTIPRAEALNRLSMES
Ca-Ugt51	681	TTITSPTRIKATISPEMTSIDETSROSFDSDALHLPRDMSERALKNLLEVSFVTSKK
Sc-Ugt51	448	KYLNPIT-SAVPSSENGKKSRFRFRERSNMS---DSQVDEIVLEIYKDAAD
Um-Ugt1	729	SHTYPLSP--STSDEPSSFDEQREAEIGWAIQDWLKSAPAKVLGLATLSSSAASMSKSP
Ca-Ugt51	741	LEDASKRYELKPHMEHSQTNLASLSLSDPSEVVKESKTAISKSIKALYSVGTHWSATPNHYF
Sc-Ugt51	503	IDSSVHSTIHLHEQE-DSQEQTVAWKPSHLNFAEMWAAKPII-----HYRNKFIFFQ
Um-Ugt1	787	TNTGA RLRRRLVLEKWTDERGDDVSRALSSNTDNDDDVLSHSILS-----THSNYSML
Ca-Ugt51	801	ELGKYYVNVKQVQERDSSQRN-FQSHFSTNSKTLASVYGHILRTVPVYGKIYVSETDVCFRS
Sc-Ugt51	554	KDDTYLIKETELEVSIANEFRYHFKEKESLSLSTVYTYLNRNVPVYGGKIYVSDTIVCFRS
Um-Ugt1	839	DADINEAAETS DHTSIVAVEFRDTEGTGEDEGLIGHTHAYLYRVLPLVAGRFVVAEHLALFRS
Ca-Ugt51	860	---LLPGVSTKMLVLPMTDLJEVRSRGLSRLLTYHGRLIYRGSSEELDLEFGSSKSRDDFO
Sc-Ugt51	614	---LLPGSNTYMLVLP LVIDVECTYKIEKLFIFGVEVLVIIVIHGHEELFFELSTEVARDIE
Um-Ugt1	899	SGIAAKTVGRITLMLVLP LHDVISAALKHVALRPGHGMVINISIGHEELFIEITSSIAHRDIEL

Ca-Ugt51	916	KVVLSVLERLHS - - - KEGFRPEPYQWGSNFEVELYKTRMEYSDSENREIQQYDNSIDIK
Sc-Ugt51	670	RIILLKLLDNIIYA - - - SSAE - - - - - LGSNLSASLGDVQHNPDS - - - - -
Um-Ugt1	959	GLIEYQLELVRRGGRESRISHAAATRERSNALVLRDLSEIRIHDPATASMASS - - - - -
Ca-Ugt51	972	FAEKKEIMARVRMFEDRLMAASGLDVLPILEDSPFFKTELRPSTSYNLTLLTIGSRGDVO
Sc-Ugt51	704	- - - - - AKLKLFEEDKINLAELGFELVPLMIDENPHYKTSIKPNKLSYKFLGLLTIGSRGDVO
Um-Ugt1	1011	- - - - - ANSSVLSQTGPGFNDNQSTSLSSQLFEFGSSVLSFADPTAPLTFMTLTIGSRGDVO
Ca-Ugt51	1032	PYIALGKGLVKEGHNVTIATHAEFGDWJKTFLGLGFKEIAGDPAELMSFMVLIHNSMSVGFEL
Sc-Ugt51	755	PYIALGKGLVKEGHNVTIATHAEFGDWJKTFLGLGFKEIAGDPAELMSFMVLIHNSMSVGFEL
Um-Ugt1	1063	PYIALGKGLVKEGHNVTIATHAEFGDWJKTFLGLGFKEIAGDPAELMSFMVLIHNSMSVGFEL
Ca-Ugt51	1092	KNAQOKFRSWILSKLLTTSWEACQGS - - - DILIESPSAMSGIHIIEALGIPYFRAFTMPWTR
Sc-Ugt51	815	REASSKFRGWLDIALLOTSEWVQNRKFDLLIESPSAMSGIHIIEALGIPYFRAFTMPWTR
Um-Ugt1	1123	REAGVTREBWDLDLLASAIWRACQGS - - - DIVLIECPSAIAGIHVLEALGIPYFRAFTMPWTR
Ca-Ugt51	1150	TRAYPHAFVFPVEQKKGGSYNYLTHVLFENIFWKGISGOVNKWRVEELDLPKTNLYRLQQT
Sc-Ugt51	875	TRAYPHAFVFPVEQKKGGSYNYLTHVLFENIFWKGISGOVNKWRVEELDLPKTNLYRLQQT
Um-Ugt1	1181	TRAYPHAFVFPVEQKKGGSYNYLTHVLFENIFWKGISGOVNKWRVEELDLPKTNLYRLQQT
Ca-Ugt51	1210	RVPFLYNVSPAILLPPSVDFPDPWJKTGTGYWFLD - - - EGSGDYKPPPEELVQFMKKASRDKKK
Sc-Ugt51	935	NVPFLYNVSPAILLPPSVDFPDPWJKTGTGYWFLD - - - DKS-TFKPPAELOEFISEARSKGK
Um-Ugt1	1241	KVPFLYNVSPAILLPPSVDFPDPWJKTGTGYWFLD - - - DKS-TFKPPAELOEFISEARSKGK
Ca-Ugt51	1266	KLVYIGFGSIVVKDAKSITKAVVSAVRPADVRCILNKGWSDRLDNKDKNELELELPPETIY
Sc-Ugt51	990	KLVYIGFGSIVVKDAKSITKAVVSAVRPADVRCILNKGWSDRLDNKDKNELELELPPETIY
Um-Ugt1	1301	KLVYIGFGSIVVKDAKSITKAVVSAVRPADVRCILNKGWSDRLDNKDKNELELELPPETIY
Ca-Ugt51	1326	NSGTIIPHDWLFPLRIDA AVHHGGSGTTGALTMRAGIPTLIKPFFGDQFFYATRLEDLGAIGIA
Sc-Ugt51	1050	NIIGNVPHDWLFPLRIDA AVHHGGSGTTGALTMRAGIPTLIKPFFGDQFFYATRLEDLGAIGIA
Um-Ugt1	1361	QVSSIVPHDWLFPLRIDA AVHHGGSGTTGALTMRAGIPTLIKPFFGDQFFYATRLEDLGAIGIA
Ca-Ugt51	1386	LKKLTAKTIGDGLVKA THDILKILDKAKRVSQQIKHEHGVLSAIESITYSELEYASRLTIK
Sc-Ugt51	1110	LKKLTAKTIGDGLVKA THDILKILDKAKRVSQQIKHEHGVLSAIESITYSELEYASRLTIK
Um-Ugt1	1421	VRQLTIVDSLAKALVRA TSDKKQIDRAIRLGEIQRTEDGVGDIAVKAIYRDLLEYATISLTKRD
Ca-Ugt51	1446	DIHNQNYKRHHVPVSGVQTPAYDITDSDDYDDD EDDDESIDKDD EEEFEENSVDGYDANG
Sc-Ugt51	1170	- - - - - VKTIR - - - - - KIKKEENVDAKLTALETIDEGWTMTI - - -
Um-Ugt1	1481	TRIEHMP - - - - - MVTRTRTDTA LARRGKDTSVAVQDENEDGHISDEWSDLIGGGS
Ca-Ugt51	1506	VNNSRSQNSSN - - - - -
Sc-Ugt51	0	ESSPRDETEVPRSSLI LNRLP
Um-Ugt1	1532	ESSPRDETEVPRSSLI LNRLP

Abbildung 15: Vergleich zu Sequenzähnlichkeiten von Ugt1 (diese Arbeit; Um-*U. maydis*), Ugt51 aus *C. albicans* (Ca) und Ugt51 aus *S. cerevisiae* (Sc) auf Proteinebene. Angegeben ist der ganze ORF der Proteine. Die Sequenzen wurden mit dem Programm CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) in Übereinstimmung gebracht und in dem Programm Seq.Vu 1.0.1 graphisch dargestellt. Identische Aminosäuren sind in Kästen dargestellt. Homologe Aminosäuren sind grau unterlegt. Konservierte Genabschnitte sind in Rahmen gefasst: Von Aminosäure 385 bis 537 und von 856 bis 920 liegt eine GRAM (Glucosyltransferases, Rab-like GTPase activators and Myotubularins)-Domäne, von Aminosäure 437 bis 528 liegt eine PH-Domäne (Pleckstrin-Homology) und von Aminosäure 1368 bis 1449 eine UDPGT (UDP-glucuronosyl and UDP-glucosyltransferase)-Domäne vor (Blast2, (Altschul *et al.*, 1990; Doerks *et al.*, 2000).

2.3.4 Herstellung und Analyse *ugt1*-defizienter *Ustilago maydis* Stämme

Konstruktion von *ugt1*-Deletionsstämmen

Um nachzuweisen, ob Ugt1 am Ustilaginsäure-Stoffwechsel beteiligt ist, sollten *ugt1*-defiziente Stämme hergestellt werden. Hierzu wurden das Plasmid pKJ61 konstruiert, das zwar an den Flanken identisch zum Ugt1-Gen ist, in der Mitte befindet sich aber anstatt eines 0,7 kb Fragments innerhalb des offenen Leserahmens, eine 3 kb Hygromycin-B Resistenzkassette (A). Das Plasmid wurde mit Hilfe eines Restriktionsenzym (NotI) linearisiert und in den haploiden Stamm MB215 transformiert. Um die homologe Rekombination des Deletionskonstruktes nachzuweisen, wurden von den erhaltenen Transformanten DNA isoliert und PCR-Analysen durchgeführt. Die erfolgreiche Deletion des 0,7 kb Fragments aus Ugt1 wurde anschliessend durch Southern-Analysen nachgewiesen. Die Konstruktion der Deletion ist in Abb.12A skizziert.

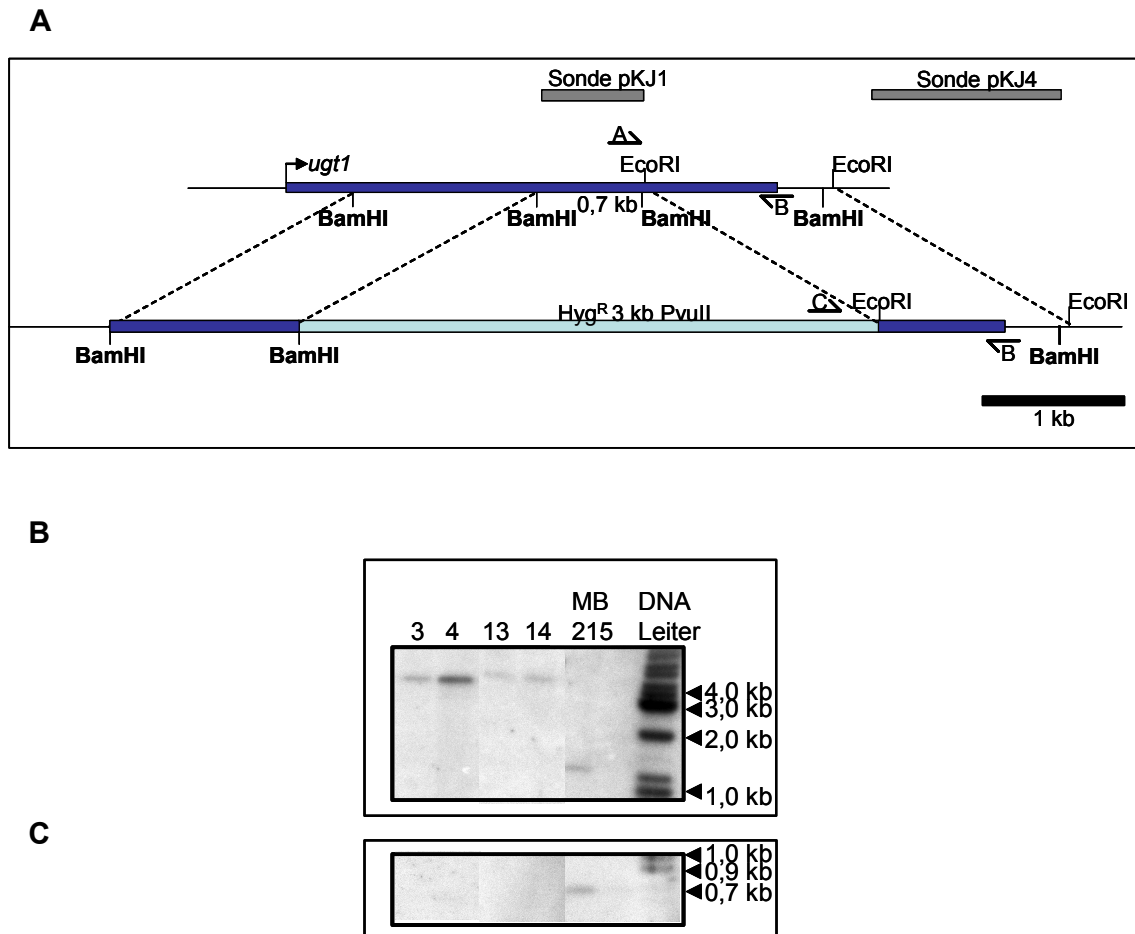


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Konstruktion von *ugt1*-Deletionsstämmen. **A.** Schematische Darstellung des *ugt1*-Lokus vor und nach der Insertion des Deletionskonstruktes. *ugt1* symbolisiert das *ugt1*-Gen, der blaue Balken stellt den ORF dar. Die dunkelgrauen Balken markieren die radioaktiv-markierten Sonden. Es wurde sowohl das entfernte 0,7 kb Fragment als auch das flankierende 1,4 kb EcoRI Fragment aus pKJ 4 als Sonde verwendet. Zusätzlich wurde die Deletion mit Hilfe von PCR-Analysen verifiziert. Die verwendeten Primer sind als Pfeile gekennzeichnet. **B.** Für Southern Analysen wurde genomische DNA der erhaltenen Transformanten und ihr Ausgangsstamm MB215 isoliert, mit BamHI restringiert und auf einem Agarosegel aufgetrennt. Mit Hilfe der radioaktiv markierten Sonden wurde die Integration der Hygromycin-Kassette untersucht. Findet eine Integration der Hygromycin-Kassette statt, so vergrößert sich die detektierte BamHI 1,3 kb-Bande (Kontrolle MB215) auf 4,4 kb (Proben 3,4,13 und 14). **C.** Um zusätzlich den Verlust des 0,7 kb-Fragments nachzuweisen, wurde das durch die Hygromycin-Kassette ersetzte 0,7 kb BamHI Fragment als radioaktiv markierte Probe eingesetzt.

Die Southern-Analyse bestätigte die PCR-Kontrolle. In den MB215-Derivaten MB215Δ*ugt1* - 3, 13 und war das endogene 0,7 kb Fragment des *ugt1*-Gens durch die Hygromycin-B Resistenzkassette ersetzt worden. Das 0,7 kb Fragment konnte in der Southern Analyse nicht mehr identifiziert werden; dafür lag das ursprünglich 1,3 kb große BamHI Fragment nun in einer Größe von 4,4 kb vor, was der Beweis für die Integration der HygromycinB-Kassette war. Die WT-Kontrolle zeigte das 0,7 kb Fragment und das 1,3 kb grosse BamHI-Fragment. Die eindeutigen MB215 Δ*ugt1* Deletionsstämme wurden nun weiter auf Ustilaginsäure-Produktion getestet.

Ugt1-Deletionsstämme sind noch in der Lage, Ustilaginsäure zu produzieren

Die *ugt1*-Deletionsmutanten wurden in YNB-Medium + 5% Glukose auf ihre Ustilaginsäure-Produktion unter Stickstoff-limitierten Bedingungen untersucht. Als Kontrolle diente der Ausgangsstamm MB215. Genau wie der Wildtyp begannen die *ugt1*-Deletionsmutanten schon nach 24 h mit der Produktion der langen, nadelförmigen Kristalle. Um die Ustilaginsäure-Produktion zu kontrollieren und zu visualisieren, wurden die Gesamtlipide mit Ethylacetat aus dem Medium extrahiert und in einer TLC mit nachfolgender Glykolipid-Detektion analysiert (Abb.13). Die *ugt1*-Deletionsstämme zeigten im Vergleich zum Wildtyp MB215 keine Veränderung in ihrer Ustilaginsäure-Produktion.

Parallel zu den hier angeführten Untersuchungen dieser Sterolglukosyltransferasen hatte auch D. Warnecke, der schon die Sterolglukosyltransferasen in den Pilzen und Hefen *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *P. pastoris* und *D. discoideum* isoliert hatte (Warnecke *et al.*, 1999), zwei Sterolglukosyltransferasen aus *U. maydis* isoliert und kloniert. Doppel-Deletionsmutanten dieser Sterolglukosyltransferasen *ugt1* und *ugt2* wurden im Labor von C. Basse (MPI für terrestrische Mikrobiologie, Marburg) aus den haploiden Wildtypstämme FB1 und FB2 hergestellt und mir zu Untersuchungen der Ustilaginsäureproduktion zur Verfügung gestellt. Die Doppeldeletionsmutante wurden ebenfalls in YNB-Medium + 5% Glukose angeimpft und mikroskopisch auf die Ustilaginsäure-Produktion hin untersucht. Als Kontrolle dienten die Ausgangsstämme FB1 und FB2. Da diese Laborstämme erst nach 3 Tagen mit der Ustilaginsäure-Produktion beginnen, wurden die nach 5 Tagen Inkubation Gesamtlipide aus dem Medium mit Ethylacetat extrahiert und analysiert (Abb.13). Es zeigte sich, dass die $\Delta ugt1\text{-}\Delta ugt2$ -Doppeldeletions-Stämme immer noch Ustilaginsäure produzierten. Jedoch zeigten sich dabei einige Unterschiede zu den Ausgangstämmen FB1 und FB2. Die unterste Bande, die in den Ausgangstämmen schwarz gefärbt ist, erscheint in den Doppel-Deletionsstämmen blau. Zusätzlich tritt eine Bande verstärkt auf, die kurz unter der Laufmittelfront liegt. Beide veränderten Banden stehen aber offensichtlich nicht im Zusammenhang mit der Ustilaginsäure-Produktion.

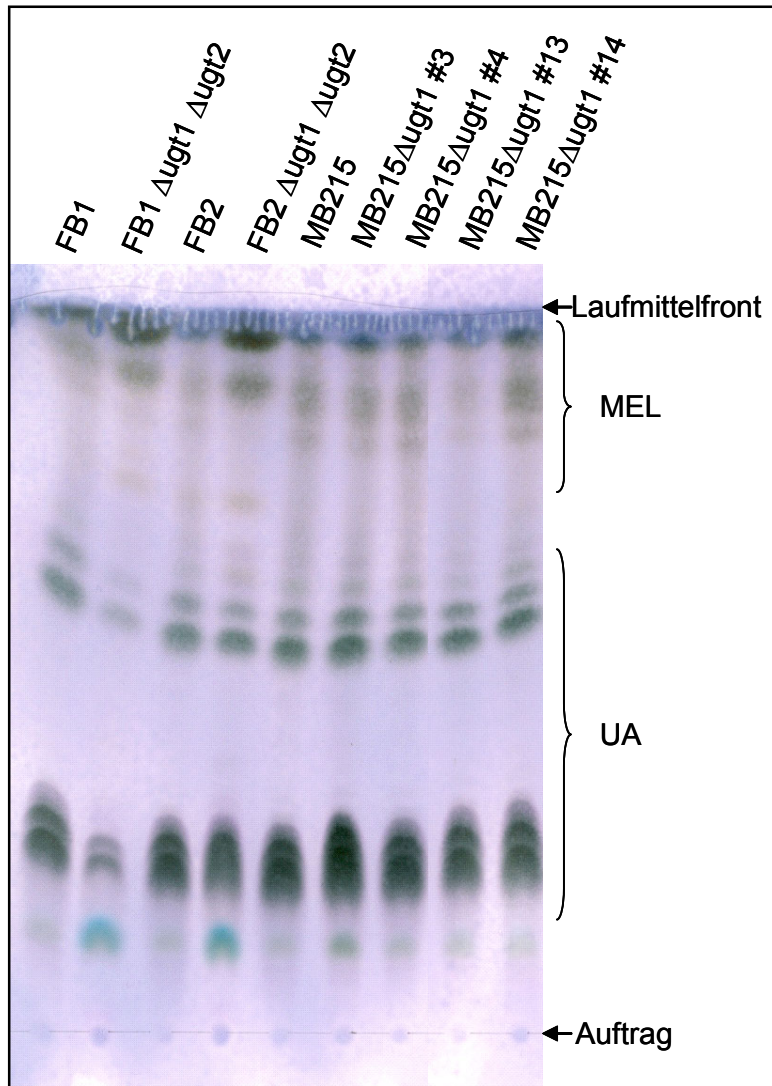


Abbildung 17: Analyse der in Sterolglukosyltransferasen defizienten Deletionsstämme *MB215Δugt1*, *FB1 Δugt1Δugt2* und *FB2 Δugt1Δugt2*. Als Kontrollen wurden die Ausgangsstämme MB215, FB1 und FB2 aufgetragen. Nach 5 Tagen Wachstum in YNB + 5 % Glukose wurden Proben genommen, die Ustilaginsäure mit Ethylacetat aus dem Medium gelöst und in der TLC aufgetrennt. In den ersten vier Spuren sind die Doppel-Deletionsmutanten und die Kontrollen mit den Ausgangsstämmen Fb1 und FB2 aufgetragen. In den folgenden Spuren ist die Ustilaginsäure-Produktion der *ugt1*-Deletionsmutanten in MB215 analysiert.

Da es nicht gelang, mit einem revers genetischen Ansatz ein Gen zu identifizieren, das an der Biosynthese der Ustilaginsäure beteiligt ist, sollte versucht werden, durch einen Mutageneseansatz Kandidatengene zu isolieren. Hierzu sollte ein Ustilaginsäure produzierender Stamm einer ungerichteten Mutagenese unterzogen werden und nach Mutanten gesucht werden, die keine Ustilaginsäure mehr sekretieren. Um aber eine große Anzahl an *U. maydis* Kolonien auf ihre Ustilaginsäure-Produktion testen zu können, musste zuerst eine geeignete Methode zum Screening der Mutanten etabliert werden. Es sollte ein Weg

gefunden werden, defiziente UV-mutagenisierten Stämme direkt auf Festmedium zu identifizieren.

2.4 Isolierung von Ustilaginsäure-defizienten UV-Mutanten

Um Ustilaginsäure-defiziente Mutanten zu erhalten, wurde eine UV-Mutagenese durchgeführt. Zunächst wurde in einem Vorexperiment die UV-Dosis für die Mutagenese so eingestellt, dass etwa 10% der Zellen überlebten (Banuett, 1991). Insgesamt wurden 2×10^6 MB215-Zellen mit einer UV-Dosis von 30 mJ/cm^2 bestrahlt.

Um die Ustilaginsäure-defizienten UV-Mutanten selektionieren zu können, war ein Detektionsverfahren nötig, mit dem möglichst viele Mutanten auf die Ustilaginsäure-Produktion hin untersucht werden könnten. In der Literatur ist eine Anzahl von Detektionsmethoden für Glykolipid produzierende Mikroorganismen beschrieben (Carillo *et al.*, 1996; Lin, 1996; Siegmund and Wagner, 1991). Die meisten Nachweisverfahren beruhen auf der Komplexbildung anionischer Tenside (Biodetergentien) mit kationischen Detergentien. Hierbei formt das kationische Detergenz Cetyl-trimethyl-ammonium-bromid (CTAB) mit dem ausgeschiedenen Biodetergenz eine wasserunlösliche Verbindung, die durch den basischen Farbstoff Methylenblau detektiert werden kann und als dunkelblauer Ring um die Kolonien erscheint (Siegmund and Wagner, 1991). *Ustilago maydis* war aber nicht in der Lage, auf CTAB zu wachsen. Selbst in geringen Konzentrationen (0,0005% CTAB) zeigte sich nur sehr langsames Wachstum und es wurde keine dunkelblaue Ringbildung um die Kolonie beobachtet. Dies war überraschend, da der Nachweis der Ustilaginsäure aus *U. maydis* explizit in der Veröffentlichung erwähnt wurde (Siegmund and Wagner, 1991). Jedoch wurde in der Veröffentlichung gereinigte Ustilaginsäure als Biodetergenz getestet, es wurden aber keine Angaben über die Wachstumsfähigkeit von *U. maydis* auf CTAB/Methylenblau-Platten gemacht (Siegmund and Wagner, 1991). Eine weitere Möglichkeit Biotenside zu detektieren, beruht auf ihrer hämolytischen Aktivität. So wurden bereits auch andere Bio-Tensid-produzierende Mikroorganismen auf Blutplatten isoliert und selektiert (Carillo *et al.*, 1996). Als Vorversuch wurde gereinigte Ustilaginsäure in Methanol oder Wasser gelöst und auf eine Blutagarplatte aufgetropft. Nach einigen Stunden wurden Lysishöfe um die Auftropfstelle sichtbar. Die Kontrolle ohne Ustilaginsäure zeigte keine Hämolyse. Es wurden ausgewählte Laborstämme (FBD11 und FB1; (Banuett and Herskowitz, 1989) und andere in der Stammsammlung vorhandene Wildisolate (MB195-215, Bub8) auf ihrer hämolytischen Aktivität hin untersucht. Für einige der untersuchten Stämme konnte ein klarer Hof um die Kolonie beobachtet werden, der auf hämolytische Aktivität verweist. Daneben wurde ein größerer Hof festgestellt, in dem es zur Braunfärbung kam. Dies ist wahrscheinlich auf die Oxidation des im Hämoglobin enthaltenen Eisens zurückzuführen. Um zu untersuchen, ob die hämolytische Aktivität auf Blutagarplatten mit der Fähigkeit zur

Ustilaginsäure-Produktion korreliert, wurde eine Ustilaginsäure-Bestimmung der getesteten Stämme durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Stärke der hämolytischen Aktivität mit der Ustilaginsäure-Produktion in stickstofffreiem Medium korrelierte.

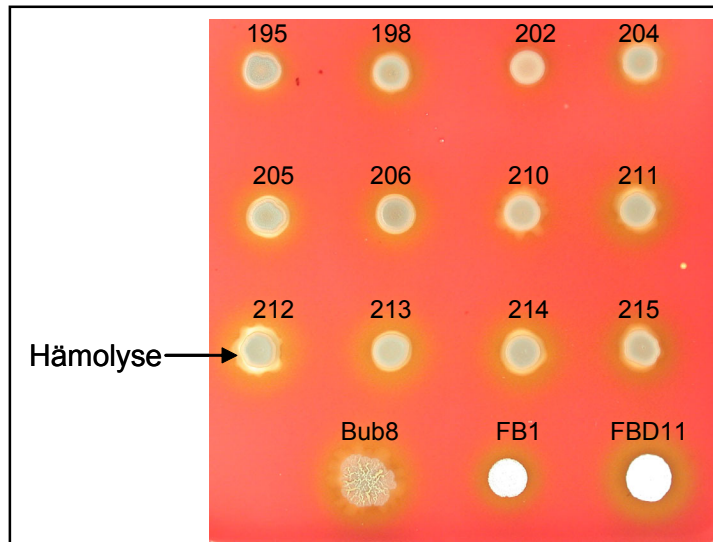


Abbildung 18: Hämolytische Aktivität ausgewählter *U. maydis*-Laborstämme und Wildisolate. FBD11 und Fb1 sind Laborstämme (Banuett and Herskowitz, 1989), bei allen anderen Stämmen handelt es sich um Wildisolate (MB215 bis MB195) aus der Stammsammlung der AG Bölker. Es wurden 3 µl aus einer ÜN YEPS-Kultur auf PD-Blutplatten aufgetropft und 2 Tage bei 28°C inkubiert. Die hämolytische Aktivität klarer Lysisring sichtbar, die braun/grüne Umrandung der Kolonien ist auf Eisenoxidation des Hämoglobins zurückzuführen.

Ob die beobachtete hämolytische Eigenschaft von *U. maydis* nur auf der Ustilaginsäure-Sekretion beruht, kann ohne eine Mutante, die definiert nur im Ustilaginsäure-Biosyntheseweg defizient ist, nicht beantwortet werden.

2.4.1 Isolierung von Hämolyse-defizienten *U. maydis*-UV-Mutanten

Zur UV-Mutagenese wurden MB215-Zellen, die zuvor in Vollmedium (YEPS) vorgezogen wurden, in einer Petrischale mit H₂O verdünnt und im Stratalinker mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm und einer Lichtstärke von 30 mJ/cm² mutagenisiert. Die Bestrahlungsintensität war im Vorversuch darauf festgelegt worden, dass 10-15% der Zellen überlebten. Die UV-Mutanten wurden auf Blutplatten ausgestrichen und 3-7 Tage bei 28°C inkubiert. Dabei wurden die Kolonien, die einen kleineren oder keinen Hämolysering ausbildeten, isoliert und erneut auf Blutplatten ausgestrichen. Aus ca. 30.000 untersuchten Einzelkolonien wurden sieben Mutanten erhalten, die eindeutig verringerte hämolytische Aktivität aufwiesen. Nach weiteren Kontrollen auf Blutagarplatten, blieben davon zwei

UV-Mutanten, die nur eine geringe Hämolyse und eine UV-Mutante, die keine Hämolyse zeigte, übrig. Bei der UV-Mutante, die keinerlei hämolytische Aktivität mehr zeigte, fiel auf, dass das Blut, das normalerweise aufgrund von Oxidation des Hämoglobins nach ca. 3 Tagen begann bräunlich zu werden, in der Umgebung der Kolonien eine hellrote Farbe aufwies. Aufgrund dieser Eigenschaft wurden die Hämolyse-defizienten UV-Mutanten MB215Red genannt (Siehe Abb.18).



Abbildung 19: Red-Mutanten sind in der Hämolyse beeinträchtigt. Es wurden drei Hämolyse-Mutanten gefunden, die keine (red1) bzw. langsamer (red2, red3) Ustilaginsäure produzieren.

2.4.2 Charakterisierung der Hämolyse-defizienten UV-Mutanten

TLC als Ustilaginsäure-Nachweis

Zuerst wurde untersucht, ob die UV-Mutanten mit verringerter hämolytischer Aktivität auch weniger Ustilaginsäure produzierten. Hierzu wurden die UV-Mutanten MB215Red1-3 in YNB-Medium + 5% Glukose zwei Wochen bei 28°C und 180 rpm inkubiert. Während dieser Zeit wurde die Ustilaginsäure-Produktion mikroskopisch verfolgt. Während die beiden UV-Mutanten, die wenig Hämolyse zeigten (MB215Red2 und MB215Red3) nach 3 Tagen mit der Produktion von langen, nadelförmigen Kristallen begann, zeigte die UV-Mutante MB215Red1 selbst nach zwei Wochen keine Produktion von Ustilaginsäure-Kristallen im Medium. Somit war MB215Red1 die einzige Mutante, die in der Ustilaginsäure-Produktion vollständig defizient war. Sie wurde weiter charakterisiert. Neben der mikroskopischen Kontrolle, wurde die Ustilaginsäure-Produktion von MB215Red1 mit Hilfe der TLC analysiert. Die Glykolipide wurden nach 5 Tagen Inkubation in YNB-Medium + 5% Glukose mit Ethylacetat direkt aus dem Medium extrahiert, aufgetrennt und durch Färbung mit Anisaldehyd nachgewiesen. Als Kontrolle wurde der Ausgangsstamm MB215 verwendet. Er zeigte bereits nach einem Tag eine deutliche Ustilaginsäure-Produktion.

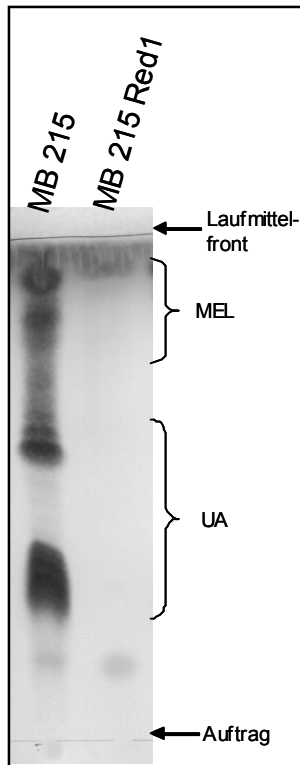


Abbildung 20: Analyse der UV-Mutante Red1 auf Ustilaginsäure-Produktion mit Hilfe der Ethylacetat-Extraktion. Als Kontrolle wurde der Ustilaginsäure-produzierende Stamm MB215 aufgetragen.

Dabei bestätigte sich die mikroskopische Untersuchung, dass der Stamm MB215Red1 keine Ustilaginsäure produziert. Es war keinerlei Glykolipid-Sekretion zu beobachten. Nur die unterste Bande der angefärbten Lipide, konnte als schwarze Bande detektiert werden. Neben den Ustilaginsäure-Banden wurden aber auch keine Mannosylerythritol-Lipide (MEL) nachgewiesen, was den Hinweis gibt, dass die gesamte Glykolipidproduktion oder –sekretion in der UV-Mutante Red1 gestört ist.

Morphologie der MB215Red1-Mutante

Bei den mikroskopischen Untersuchungen der Ustilaginsäure-Produktion der Red1-Mutante fiel auf, dass diese Mutante eine veränderte Morphologie aufwies. Die Zellen sind leicht geschwollene und etwas deformiert. Dies zeigte sich nicht nur in YNB-Medium, sondern auch in Vollmedium wie YEPS.



Abbildung 21: Phänotyp der UV-Mutante Red1 in YEPS Vollmedium. Die MB215Red1-Zellen sind geschwollen und deformiert. Der angegebene Maßstab zeigt eine Länge von 8 µm.

Die Mutante MB215Red1 ist genau wie der Ausgangsstamm MB215, der als zigarrenförmig beschrieben werden kann, ca. 10 µm lang, aber mit einer Breite von bis zu 4 µm doppelt so breit wie MB215. Die Mutante zeigt jedoch kein verlangsamtes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp.

Im Folgenden sollte bestimmt werden, ob der Phänotyp von MB215Red1 auf einem oder mehreren Mutationsereignissen beruhte. Dazu wurde eine Segregationsanalyse dieser Mutante durchgeführt. Beruht die Mutation auf einem Ereignis, sollten die Nachkommen der Kreuzung zwischen MB215Red1 (*a2b13*) und einem kompatiblen Partner zur Hälfte nicht mehr in der Lage sein, Ustilaginsäure zu produzieren.

Segregationsanalyse der MB215Red1- Mutante

Die Mutante MB215Red1 wurde zusammen mit dem kompatiblen WT-Stamm FB1 in Maispflanzen injiziert. Nach 10 Tagen konnte die Bildung von Tumoren beobachtet werden, was darauf hinweist, dass MB215Red1 noch in der Lage ist, mit einem WT-Stamm zu kreuzen und eine pathogene Reaktion zu induzieren. Aus den Tumoren wurden diploide Sporen isoliert und vereinzelt. Es wurden 45 der aus der Kreuzung der UV-Mutante MB215Red1 (*a2b13*) mit dem Wildtypstamm FB1 (*a1b1*) hervorgegangenen haploiden Sporidien auf Hämolyse untersucht. Zur Überprüfung der Kreuzungsanalyse, wurden zuerst die Paarungstypen der Segreganten bestimmt. Dabei wurden für die Segreganten folgende Verhältnisse der Aufspaltung hinsichtlich der Paarungstypen festgestellt: a1:a2 wie 22:23 und b1:b13 wie 19:26. Dieses Ergebnis bestätigt die korrekte Durchführung der Segregationsanalyse. Die Segregation hinsichtlich der Hämolyse beträgt 23 hämolysierende Kreuzungsnachkommen und 22 nicht hämolysierende Kreuzungsnachkommen. Diese Ergebnisse der Segregationanalyse wurden anhand einiger analysierten Nachkommen dargestellt und in einer Tabelle zusammengefasst. Dabei fiel aber auf, dass alle Nachkommen, die keine Hämolyse zeigten, den b13-Paarungstyp hatten und die Nachkommen, die Hämolyse zeigten, den b1-Paarungstyp aufwiesen (Tabelle 1,

).

Daraus konnte gefolgert werden, dass das betroffene Gen wahrscheinlich an den b-Paarungstyp gekoppelt ist bzw. in der Nähe des Genortes des b-Paarungstyps liegt. Der b-Paarungstyp liegt auf dem Chromosom 1 von *U. maydis*. Zudem konnte anhand der Mendelschen Segregation des untersuchten „Hämolyse-Phänotyp“ abgeleitet werden, dass die der Ustilaginsäure-defiziente Phänotyp von MB215Red1 vermutlich auf einer einzelnen Mutation beruht.

Tabelle 1: Beschreibung ausgesuchter Kreuzungsnachkommen aus FB1xMB215Red1.

Stamm	FB1	MB215 RED1	1	2	3	4	5	6	8	9	13
Paarungstypen	a1b1	a2b13	a2b1	a2b1	a1b13	a2b13	a1b13	a1b1	a1b13	a2b13	a1b1
Hämolyse	+	-	+/-	+	-	-	-	+	-	-	+
Morphologie	wt	d	wt	wt	d	d	d	wt	d	d	wt

Die Kreuzungsnachkommen sind von 1-13 nummeriert.

Die Phänotypen sind mit wt=zigarrenförmiger Wildtyp und d=deformiert abgekürzt.

Um nun sicher zu gehen, dass die Kreuzungsnachkommen, die nicht in der Lage sind, Blut zu lysieren auch keine Ustilaginsäure produzieren, wurde die Ustilaginsäure-Produktion der Nachkommen mit Hilfe einer TLC visualisiert. Es zeigte sich, dass alle Nachkommen, die keine Hämolyse zeigten und keine Ustilaginsäure produzierten den Paarungstyp a_xb13 und den deformierten Phänotypen von MB215Red1 zeigten.

Da nach der Kreuzung keine Nachkommen vorlagen, die den Phänotypen von MB215Red1 aber nicht den b-Paarungstyp b13 trugen, war es nicht möglich, Pathogenitätstest mit Stämmen durchzuführen die beiden den MB215Red1 Phänotyp aufweisen.

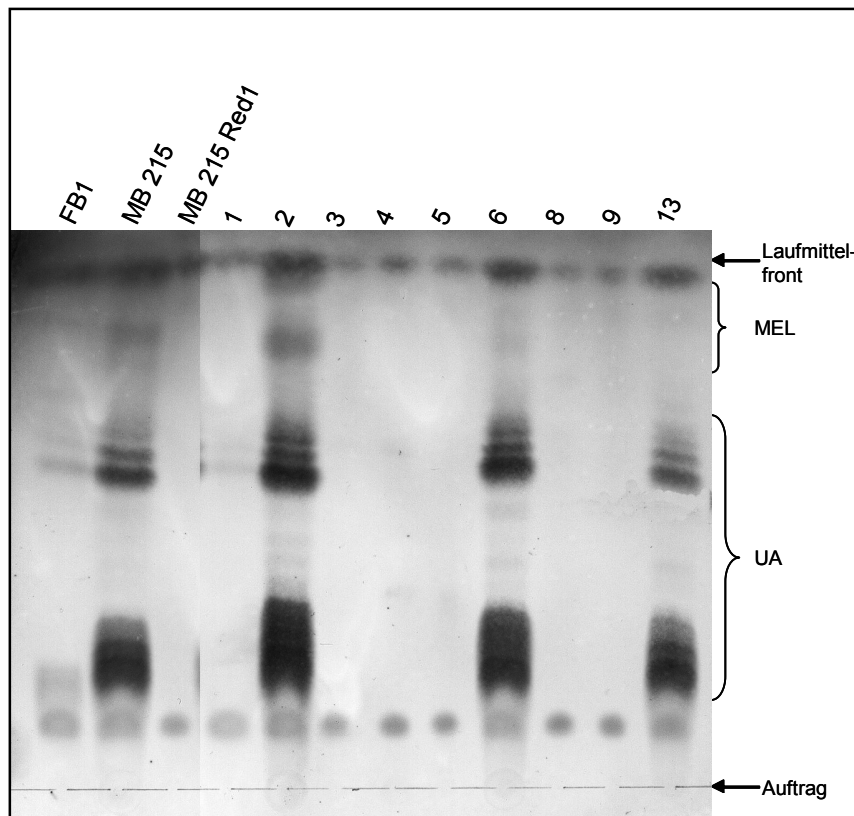


Abbildung 22: Analyse der Ustilaginsäure-Produktion der Kreuzungsnachkommen von FB1 x MB215Red1. Nach 3 Tagen Wachstum in YNB-Medium + 5 % Glukose wurden Proben genommen, die Ustilaginsäure in Ethylacetat gelöst und in der TLC aufgetrennt und detektiert.

Um nun das Gen zu identifizieren, durch dessen Mutation dieser Phänotyp auftritt, sollte die UV-Mutation mit einer Genbank komplementiert werden.

2.4.2 Komplementation der UV-Mutante Red1

Nachdem durch die Segregationsanalyse gezeigt werden konnte, dass es sich um eine einzelne Mutation handelt, die den Ustilaginsäure-defizienten Phänotyp und die Deformation der Zelle auslöst, wurde die UV-Mutante MB215Red1 mit einer freireplizierenden Cosmidbank (M&M, Cosmidbank pSCos UstilaginsäureRS Cbx), die in 42 Pools von je 96 einzelnen Cosmiden vorlag, transformiert. Die 4.032 Cosmide decken bei einer Genomgröße von *U. maydis* von etwa 20 Mbp und einer durchschnittlichen Länge der Cosmid-DNA-Fragmente von 40 kb das Genom etwa 8 fach ab und sollten theoretisch ausreichen, ein gesuchtes Gen mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,999 finden zu können (Clarke and Carbon, 1976). Die Transformanten wurden auf Carboxin-haltigem Medium selektioniert und anschliessend auf ihre hämolytische Aktivität auf Carboxin-haltigen Blutagarplatten getestet. Im Fall einer erfolgreichen Komplementation sollten die Transformanten in der Lage sein, wieder Hämolyse-Ringe um die Kolonien zu bilden.

Es konnten drei Transformanden isoliert werden, die den hämolysierende Phänotyp wieder zeigte (Abb.18). Aus diesen konnte das Cosmid pScosRed1 durch Retransformation in E.coli wieder aus den MB215Red1 Zellen isoliert werden. Zusätzlich zur wiederhergestellten Hämolysen wurde auch der geschwollene Phänotyp durch das eingebrachte Cosmid teilweise aufgehoben und ein Grossteil der Zellen erschien wieder zigarrenförmig. In einer TLC konnte auch die Komplementierung der Ustilaginsäure-Produktion bestätigt werden. Die Komplementierung ist im Vergleich zum Laborstamm FB1, dem Ausgangsstamm MB215, der UV-Mutante **MB215Red1 dargestellt**.

In der Abbildung 18 ist deutlich zu erkennen, dass in der Umgebung der UV-Mutanten die rote Farbe der Blutplatten erhalten bleibt, während der Sektor, der keine Kolonien trägt nach ungefähr 3 Tagen aufgrund der Oxidationsprozesse beginnen braun zu werden.

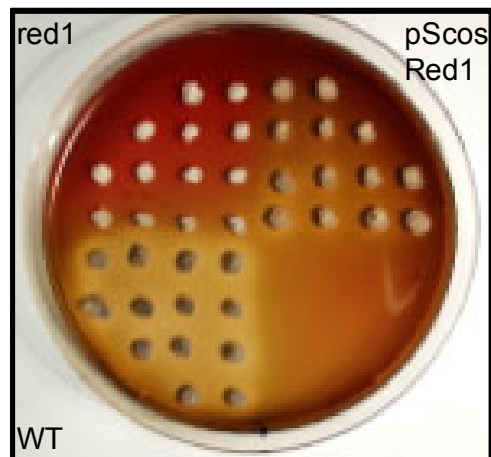


Abbildung 23: Komplementation des Hämolysen-defizienten Stamm MB215Red1 mit dem Cosmid pScosRed1 aus der Cosmid-Genbank. Die Platte wurde 2 Tage bei 28°C inkubiert. Es sollte sowohl gezeigt werden, dass pScosRed1 die UV-Mutation in MB215Red1 komplementiert, als auch, dass die UV-Mutante MB215Red1 in der Lage ist, das Blut vor Oxidation zu schützen.

Bei der Analyse des isolierten Cosmids zeigte sich, dass das Cosmid ein unerwartet kleines Insert trägt. Die Größe betrug nur 10 kb, was eventuell auf eine nachträgliche Veränderung des Cosmids hindeutet. Diese Veränderung muss nach der Infektion der Wirtsbakterien erfolgt sein, da während der Verpackung der Cosmide in λ -Phagenköpfe eine Größenselektion stattfindet. Das isolierte Cosmid pScosRed1 wurde über Restriktionsanalysen kartiert (Abb.21) und vollständig sequenziert.

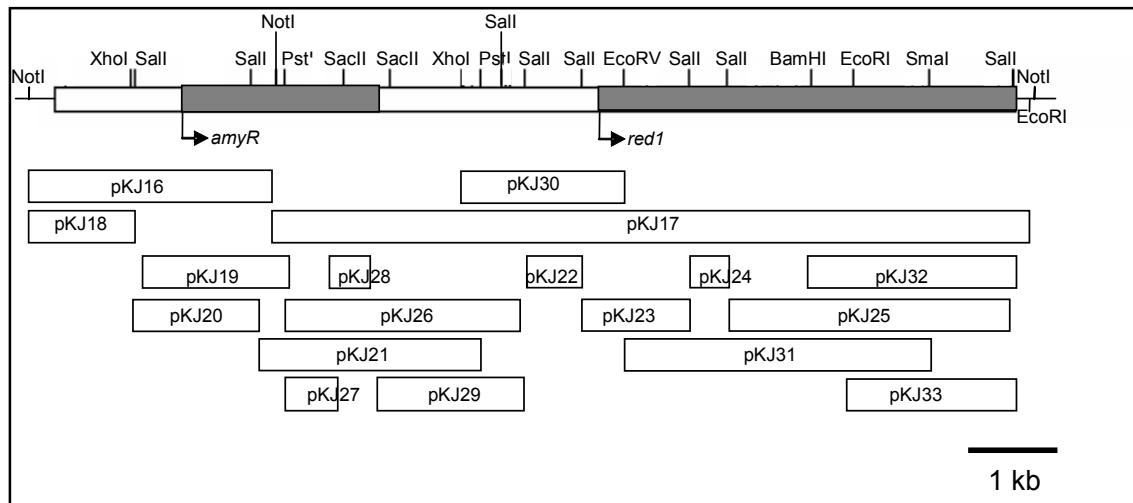


Abbildung 24: Kartierung des Cosmids pScosRed1. Die verschiedenen subklonierten Fragmente sind schematisch als Balken dargestellt. Die bei der Kartierung verwendeten Restriktionsschnittstellen sind angegeben. Die Beschreibung der Subklone ist im Methodenteil zu finden.

Auf dem sequenzierten Cosmid pScosRed1 befanden sich zwei potentielle ORFs. Im 5' Bereich von pScosRed1 war ein 2271 bp großer ORF. Die Sequenz weist Homologien zu *amyR* auf. AmyR ist ein Transkriptionsfaktor mit Zn-Finger-Motiv, der am Amylase-Stoffwechsel von *Aspergillus nidulans* beteiligt ist (Tani *et al.*, 2001). Im 3' Bereich von pScosRed1 lag ein 4472 bp grosser Retrotransposon-ORF, der aber am 3' Ende des Cosmids nicht vollständig war. In dem komplementierenden Cosmid war der LTR-Bereich nur 264 bp lang. Die LTR der Retrotransposons in *U. maydis* sind zwischen 618 und 900 bp lang (Ladendorf, 2003). Das Retrotransposon wurde unabhängig von O. Ladendorf in *U. maydis* identifiziert und aufgrund seiner Verwandtschaft zu den Mais-Transposons Hopscotch „Hobbes“ genannt. Das Retrotransposon und die flankierenden LTR werden in folgenden Abschnitten näher beschrieben.

LTR-Retrotransposons sind von LTRs flankiert, die cis-regulatorische Sequenzen zur Verfügung stellen, welche zur Transkription eines RNA-Intermediats benötigt werden. Außerdem werden sie bei der Wiederherstellung der vollständigen DNA-Sequenz durch reverse Transkription benötigt. Der ORF der LTR-Retrotransposons kodiert für ein langes Gag-Pol-Poly-Protein. Gag steht für die inneren Strukturproteine: die Capsid-ähnlichen Proteine und die Nukleinsäurebinde-Proteine. Pol steht für die zur reversen Transkription und Integration benötigten Gene: die Protease für die Prozessierung des Polyproteins, Integrase, reverse Transkriptase und RNaseH. Im 5' Bereich direkt nach dem LTR vor dem Gag-ORF liegt eine Primer-Binde-Region (PBS), an die kurze RNA-Stücke zur reversen Transkription des DNA-Intermediats binden. Im 3' Bereich vor dem LTR hinter dem Pol-ORF ist eine Polypurin-Sequenz (PPT), die zur Termination der reversen Transkription dient. Die LTR-Retrotransposons können in die zwei Gruppen, Copia und Gypsy, die nach den *Drosophila* Retrotransposons benannt sind, unterteilt werden. Sie unterscheiden sich durch die Position

der Integrase, die im Gypsy-Retrotransposon auf der 3'Seite und im Copia-Retrotransposon auf der 5' Seite der reversen Transkriptase liegt. Beide Gruppen wurden in Pilzen und Pflanzen nachgewiesen (Flavell *et al.*, 1997). In Copia-Typ-Retrotransposons aus Mais (*Zea mays*) liegt das Polyprotein in zwei verschobenen Leserahmen vor, während sie in *Drosophila melanogaster* einen durchgehenden Leserahmen haben. Die geringe (10-20%) Expression der Pol-Proteine im Vergleich zu den Gag-Proteinen wird durch ribosomales „Frameshifting“ erreicht. Bei *D. melanogaster* wird die gleichmäßige Verteilung der Expression des Pol-ORFs im Vergleich zum Gag-ORF dadurch verhindert, dass der Pol-ORF durch Splicing entfernt wird und nur 10% der Transkripte exprimiert werden (Mount and Rubin, 1985; Rushforth and Anderson, 1996). So werden mehr Strukturproteine im Gegensatz zu enzymatischen Proteinen produziert.

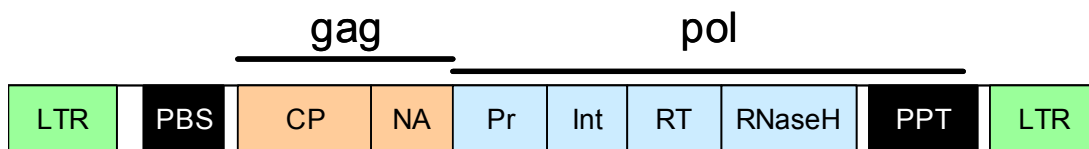


Abbildung 25: Aufbau eines Copia-Typ Retrotransposons. Die Long Terminal Repeats (LTR) liegen als „Direct Repeats“ an den Retrotransposon Flanken und enthalten Signale zur Initiation und Termination der Transkription. Neben den LTRs liegt auf der linken Seite eine Primer-Binde-Region (PBS) und auf der rechten Seite ein Polypurin-Gebiet (PPT). Der Gag-ORF kodiert für ein Kapsel-Protein (CP) und ein Nukleinsäure-Binde-Protein (NA). Der Pol-ORF kodiert für ein Polyprotein mit einer Protease (Pr), Integrase (Int), reverse Transkriptase (RT) und RNaseH. Copia-Typ-Retrotransposons liegen in verschobenen Leserahmen vor, die um +1 verschoben werden müssen, um auch den Pol-ORF zu exprimieren. So werden mehr Verpackungsproteine im Gegensatz zu enzymatischen Proteinen produziert. Die hier aufgezeichneten Elemente zeigen die Organisation, aber nicht die Grösse dieser Elemente. So ist z.B. der LTR ungefähr 600 bp gross und die PBS nur 15-30 bp gross.

Deletionsanalysen sollten einen Hinweis darauf geben, welcher der beiden ORFs die Mutation in MB215Red1 komplementierte. Bei der einen Deletion wurden 3 kb aus einem Retrotransposon ORF entfernt, indem pScosRed1 mit EcoRV und SmaI geschnitten und religiert wurde. Dabei blieb der Leserahmen erhalten. Dieser Klon komplementierte die Mutante weiterhin, was den Hinweis darauf gab, dass *amyR* für die Komplementation verantwortlich ist. Eine weitere Deletion von 6 kb, bei der ein Großteil des *amyR*-ORFs und der N-Terminus des Retrotransposon entfernt wurde, konnte die Mutation nicht komplementieren, was die Annahme verstärkte, dass *amyR* die Mutation komplementierte.

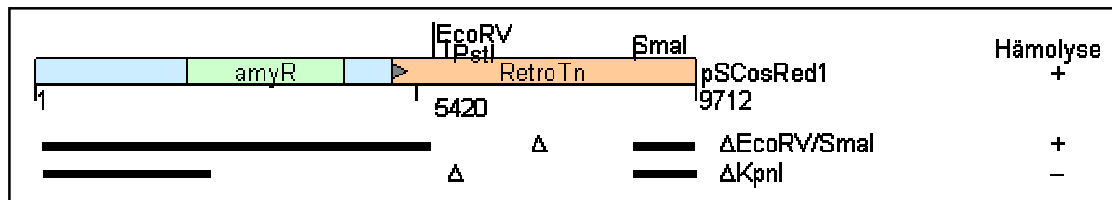


Abbildung 26: Skizze der die UV-Mutante MB215Red1 komplementierenden pSCosRed1 und Deletionsanalyse der Subklone. Im 5' Bereich liegt ein ORF für einen Transkriptionsfaktor *amyR*. Im 3' Bereich liegt ein ORF für ein Retrotransposon (RetroTN), der allerdings im C-Terminus nicht vollständig ist. Der LTR des RetroTN ist als grauer Pfeil markiert, er liegt allerdings nur als Teilstück eines LTR vor. Der Bereich des Retrotransposons ist hellgrau gekennzeichnet. Die deletierten Bereiche und die Restriktionsstellen sind in der Skizze angegeben.

Um nachzuweisen, dass die Mutation in *amyR* stattgefunden hat, wurden Deletionsmutanten von *amyR* in dem Stamm MB215 hergestellt. Hierzu wurden die Mutanten über eine PCR-Strategie zur Generierung von Deletionsmutanten hergestellt und über Southern-Analyse bestätigt. Die erhaltenen MB215Δ*amyR*-Mutanten wurden auf ihre hämolytische Aktivität und ihre Ustilaginsäure-Produktion untersucht. Sie zeigten alle Hämolysse und produzierten in Ustilaginsäure-Medium Ustilaginsäure (Daten nicht gezeigt).

Da die Subklonierung der auf dem Cosmid pSCosRed1 enthaltenen ORF kein eindeutiges Ergebnis erbrachte wurde zuerst versucht, durch Komplementation mit einer genomischen frei replizierenden *U. maydis* Plasmidbank weitere komplementierende Klone zu identifizieren. Dazu wurde die genomischen pCM54 Plasmidbank (M&M) benutzt, die 8 kb Fragmente genomischer *U. maydis* DNA in der *Bam*HI Schnittstelle von pCM54 enthält. Aus der Plasmidbank konnten drei Klone isoliert werden, die den hämolysierenden Phänotyp zeigten. Zusätzlich wurde auch der geschwollene Phänotyp wieder aufgehoben. Von diesen drei Plasmiden konnte nur eines durch Retransformation in *E. coli* wieder isoliert werden. Dieses zeigte z.T. eine ähnliche Restriktionskarte wie das Cosmid pSCosRed1 und wurde pCM54Red1 genannt. Das Plasmid pCM54Red1 wurde subkloniert und das Insert vollständig sequenziert.

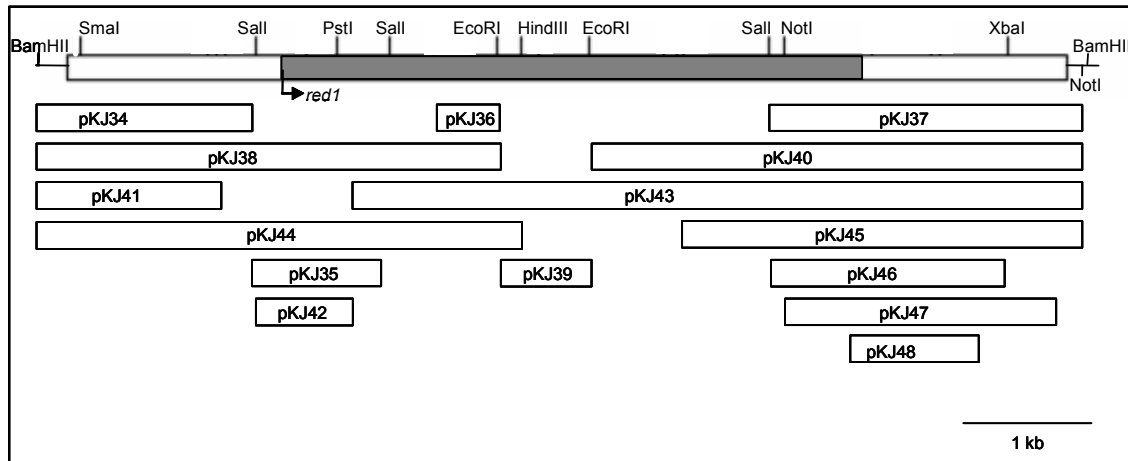


Abbildung 27: Kartierung des Cosmids pCM54Red1. Die verschiedenen subklonierten Fragmente sind schematisch als Balken dargestellt. Die bei der Kartierung verwendeten Restriktionsschnittstellen sind angegeben. Die Beschreibung der Subklone ist im Methodenteil zu finden.

Auf dem Plasmid liegt ein 4461 bp ORF, der ebenfalls Homologien zu einem Retrotransposon-Elemente der Copia-Gruppe zeigt. Dieser durchgehende ORF ist von zwei „Long Terminal Repeats“ (LTR) mit einer Länge von jeweils 772 bp flankiert. Darüber hinaus findet sich am 3' Ende ein zusätzlicher LTR, der in entgegengesetzter Richtung zum vorherigen liegt und ebenfalls 772 bp lang ist.

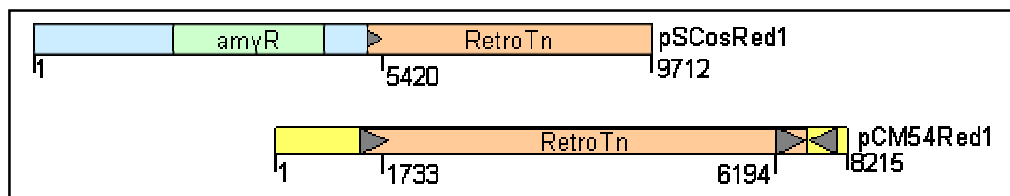


Abbildung 28: Vergleich der MB215Red1 komplementierenden Klone pScosRed1 und pCM54Red1. Als Graue Pfeile sind die LTRs des Retrotransposons dargestellt. In rot ist das Retrotransposon dargestellt. Die Werte geben neben der Länge des Inserts auch den Start und Stop des Retrotransposon ORF an.

Im Vergleich der beiden komplementierenden Klone pScosRed1 und pCM54Red1 stellte sich eine überlappende Sequenz von 4292 kb heraus. Im 5' Bereich wiesen die Sequenzen von pScosRed1 und pCM54Red1 keine Homologie auf. Nukleotidsequenz und Alignment der isolierten Klone pScosRed1 und pCM54Red1 befinden sich im Anhang.

Der komplementierende Bereich konnte durch weitere Subklonierungen auf einen Bereich von 2 kb eingegrenzt werden. Dies gelang jedoch nur, wenn es sich dabei um Deletionsklone des komplementierenden Plasmids pCM54Red1 handelte, d.h. wenn pCM54 als Vektor-„Rückrat“ diente. Wurden Fragmente dieses Klons in andere integrativen Vektoren kloniert, so fand keine Komplementierung statt. Der Vektor alleine aber komplementierte den Red1-Phänotyp nicht. Dieser „Vektor-Effekt“ könnte auf die hohe Kopienzahl, in der pCM54 in *U. maydis* Zellen vorliegt, zurückgeführt werden (Tsukuda *et al.*, 1988).

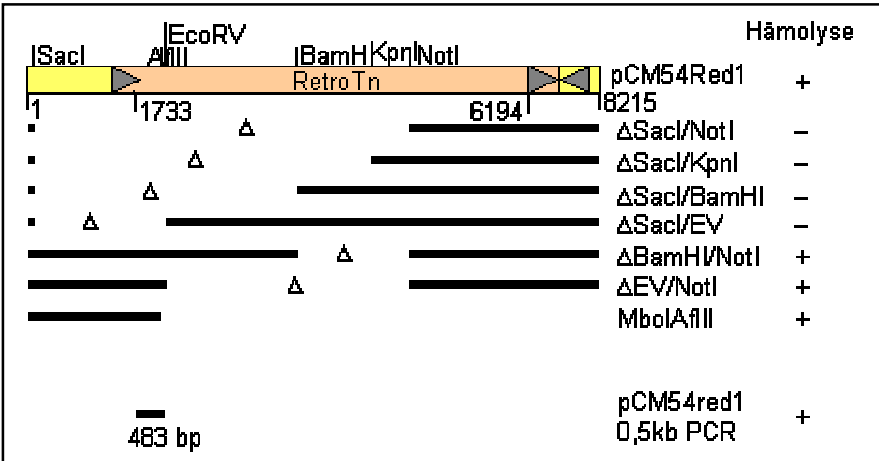


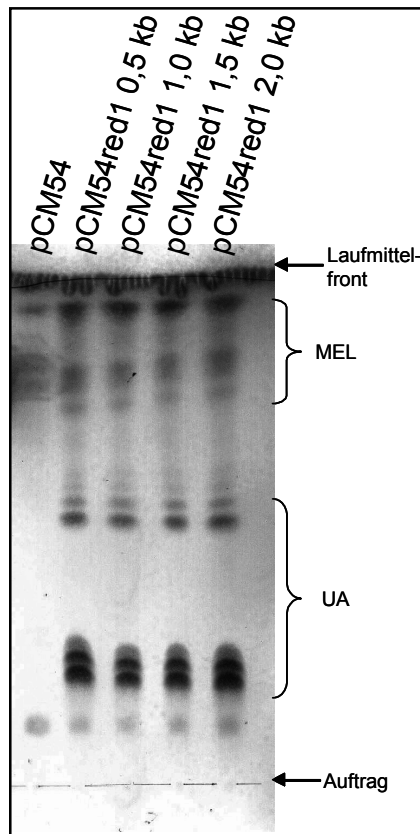
Abbildung 29: Skizze der die UV-Mutante MB215Red1 komplementierenden pCM54Red1 und Deletionsanalyse der Subklone. Auf dem Klon liegt ein ORF für ein Retrotransposon (RetroTN), Die LTR des RetroTN sind als graue Pfeile markiert. Das Retrotransposons ist Rot gekennzeichnet. Die deletierten Bereiche und die Restriktionsstellen sind in der Skizze angegeben. Nähere Details komplementierende Fragment war ein 483 bp-PCR-Fragment, das über BamHI-Restriktionsschnittstellen in pCM54 kloniert wurde.

Der komplementierende Bereich ließ durch Vergleich der Subklone von pScosRed1 (Abb.22) und pCM54Red1 (Abb.26) auf 513 bp reduzieren. Von diesem 513 bp sind 273 bp Teil des LTRs (Long Terminal Repeat) und die übrigen 240 bp der N-Terminale Teil des vom Retrotransposon kodierten Gag-Pol-Polyproteins.

Um das komplementierende Fragment weiter einzugrenzen, wurden in diesem Bereich durch PCR 2,0- 1,5- 1,0- und 0,5 kb Fragmente generiert, die in pCM54 kloniert wurden. Ein 483 bp Fragment (in der Skizze als 0,5 kb Fragment bezeichnet) konnte nach Transformation in MB215Red1 Zellen den WT-Phänotyp in Bezug auf seine hämolytische Aktivität und die Morphologie wieder herstellen. Dieses 483 bp-Fragment enthält 243 bp aus dem LTR, zwischen LTR und dem Gag-pol-Polypolprotein ORF 4 bp und 236 bp kodieren für den N-terminalen Bereich des Gag-Pol-Polypolproteins. Dies bestätigt die bereits aus der Deletionsanalyse abgeleitete Eingrenzung des komplementierenden Bereichs. Die Ustilaginsäure-Produktion wurde in einer TLC aus dem Gesamtextrakt mit Ethylacetat und nachfolgender Glykolipiddetektion nachgewiesen.

Ausserdem konnte auch die hämolytische Aktivität nachgewiesen werden.

A



B

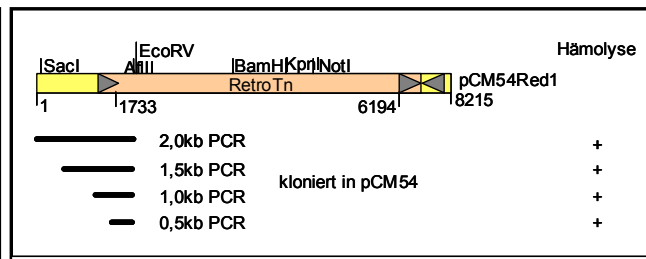


Abbildung 30: TLC zum Nachweis der Komplementation der UV-Mutante KJ215Red1. B: Der Leervektor pCM54 diente als Kontrolle des komplementierenden Fragments. In den Vektor pCM54 wurden über PCR-generierte Fragmente mit BamHI Restriktionsschnittstellen kloniert. Für diese PCR-Fragmente diente das kleinste komplementierende Deletionskonstrukt (pCM54red1MboI/AflIII) als Template. A: Nach 5 Tagen Wachstum in YNB + 5 % Glukose wurden Proben genommen und mit der TLC analysiert.

2.4.3 Analyse des Retrotransposons in *U. maydis*

Das in dieser Arbeit durch Komplementation des Ustilaginsäure-Defekts identifizierte Retrotransposon hat einen durchgehenden Leserahmen. Es kann innerhalb der Gruppe der Copia-ähnlichen Retrotransposons zu dem Mais-Retrotransposon Hopscotch gruppiert werden, das ebenfalls einen durchgehenden Leserahmen hat.

Zu diesem Ergebnis kamen auch Analysen der Retrotransposon-Elemente in *U. maydis*, die von O. Ladendorf anhand der Genom-Sequenz durchgeführt wurden. Es wurde herausgefunden, dass es 20 Kopien dieses „Hobbes“ Retrotransposons in *U. maydis* gibt (O. Ladendorf, pers. Mitteilung). Dabei fiel auf, dass jeweils pro Chromosom ein Retrotransposon vorlag. Die Chromosomen, auf denen kein Retrotransposon identifiziert wurden, zeigen Lücken in der Sequenz, wodurch nicht auszuschließen ist, dass eventuell jedes Chromosom genau ein Retrotransposon trägt. Die Retrotransposons in den analysierten Sequenzen liegen z.T. nur fragmentarisch vor, d.h. sie zeigen häufig keinen durchgehenden ORF mehr oder es sind nur Teile des Retrotransposons zu finden.

Es wurde versucht, ob die von O. Ladendorf klonierte Kopie dieses Retroelementes in der Lage ist, ebenso wie das in dieser Arbeit isolierte Retrotransposon den Phänotypen der *Red1*-Mutante zu komplementieren. Dazu wurde ein von O. Ladendorf in den autonom replizierenden Vektor pNEBUH klonierte Kopie in MB215Red1 transformiert. Im Gegensatz zu der durch pScosRed1 und pCM54Red1 erfolgten Komplementation wurde hier keine Komplementation beobachtet. Deshalb wurde das komplementierende Retrotransposon *HobS-Red1* genannt, um dieses von den anderen Retrotransposon zu unterscheiden. In der Genomsequenz konnte eine exakte Kopie dieses Retrotransposons auf dem Chromosom 12 gefunden werden.

Um herauszufinden worauf die Komplementation der UV-Mutation durch das RetroTransposon-Teilstück basieren könnte, wurde eine Expressionsanalyse dieses komplementierenden DNA-Fragments durchgeführt.

Die Expression von *red1* ist in der UV-Mutante MB215Red1 erhöht

Um die Expression von *red1* in der UV-Mutante MB215Red1 mit der Expression von *red1* im Ausgangstamm zu vergleichen, wurde eine Northernanalyse durchgeführt. Gleichzeitig wurde auch untersucht, ob es Unterschiede in der *red1* Expression zwischen dem Laborstamm FB1, dem Wildisolat MB215 und der UV-Mutante MB215Red gibt und ob die Komplementation des *red1*-Phänotypen Auswirkungen auf Expressionsebene zeigt.

Zur Detektion wurde ein 0,4 kb Fragment aus dem ORF des Retrotransposons verwendet. Es fiel auf, dass nur in der UV-Mutante ein ca. 6 kb großes Transkript exprimiert wird, das den Vollängentranskript des Polyproteins entspricht. Durch Einbringung des komplementierenden Plasmids pScosred1 wird die Expression von *red1* anscheinend wieder reprimiert. Zusätzlich sieht man in MB215Red1 Expression von zwei kürzeren Transkripten, die auch in FB1, FB2, FBD11 und MB215 exprimiert werden (Abb.33).

Zur Kontrolle der Beladung des Northern-Blots wurde eine Hybridisierung mit einem Fragment des Gens für die PeptidylProlycis-transIsomerase (*ppi1*) durchgeführt. Diese zeigen die erwartete konstitutive Expression. Ausserdem wurde durch eine Methylenblau-Färbung der gleichmäßige Transfer der ribosomalen RNA auf die Membran überprüft.

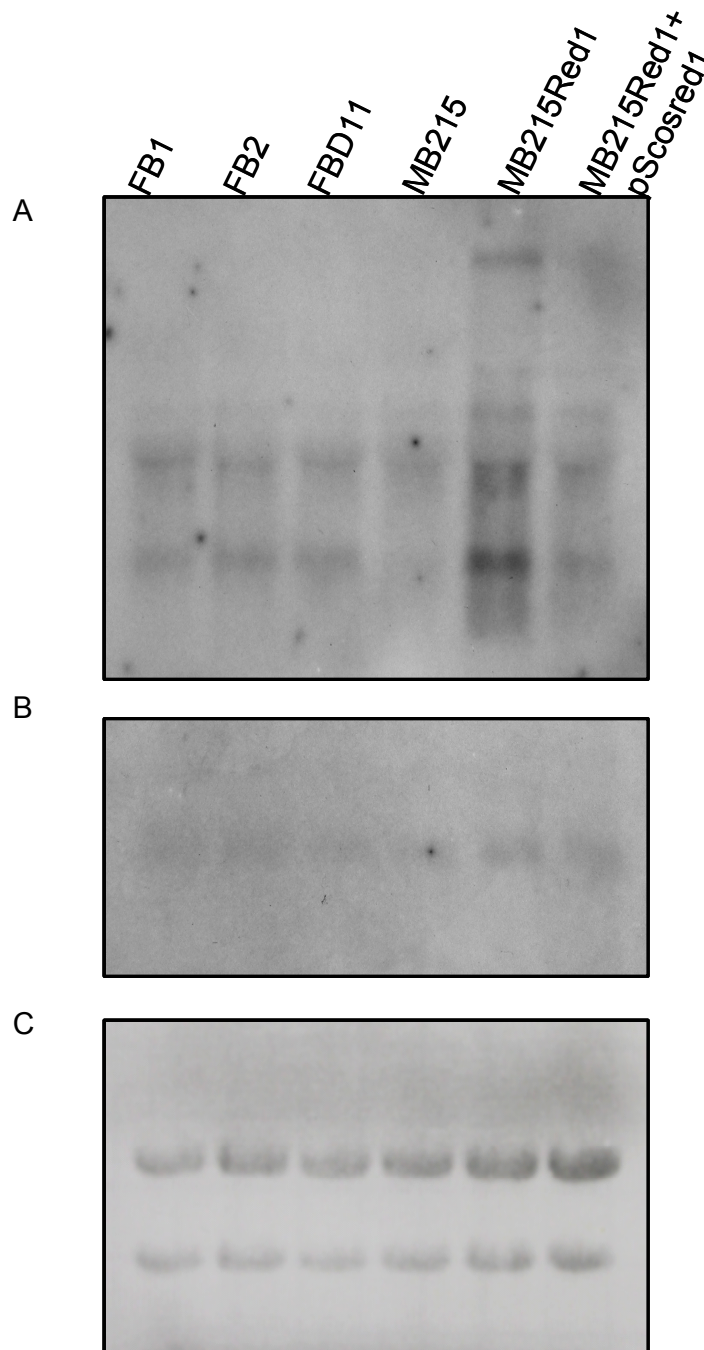


Abbildung 31: Expressionsanalyse des Retrotransposons Hobbes-Red1. Die verwendeten Stämme sind über den Spuren angegeben. Die Stämme wurden in PD-Medium für ca. 16 h bis zu einer OD_{600} von 0,5 inkubiert. Die mit pScosRed1 komplementierte UV-Mutante MB215Red1 wurde zusätzlich mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Carboxin inkubiert, da es sich um ein frei-replizierendes Plasmid handelt und so ohne Selektionsdruck verloren gehen könnte. Es wurden 6 μg RNA pro Spur aufgetragen. **A:** Zur Überprüfung der Expression des Retrotransposons Hobbes-Red1 wurde ein 0,4 kb SalI Fragment aus pKJ24 verwendet. **B:** Zur Mengenkontrolle diente das konstitutiv exprimierte Gen der Peptidyl Prolyl, *cis-trans* Isomerase (*ppi1*) sowie die Methyleneblau-Färbung (**C**).

Southern Analyse

Zur weiteren Untersuchung der Retrotransposons in *U. maydis* wurden Southern-Analysen durchgeführt. Es sollte untersucht werden, ob Unterschiede in der Anzahl der Retrotransposons zwischen den Stämmen bestehen. Hierzu wurde ein 239 bp grosses EcoRV-PstI-Fragment aus dem 5' Bereich des ORF von Hobbes-Red1 als Sonde eingesetzt. Die DNA wurde so geschnitten, dass mit dieser Sonde ein Randfragment detektiert wird, das bis zur ersten PstI-Schnittstelle in der flankierenden Sequenz reicht. Untersucht wurden sowohl die Laborstämme FB1, FB2, der diploide Stamm FBD11 sowie deren Ausgangsstämme 518 und 521. Der Stamm 521 ist von Bayer sequenziert worden. Zusätzlich wurden der im Labor häufig eingesetzte Stamm Bub8 und der zur Ustilaginsäure-Produktion ausgewählte Stamm MB215, sowie dessen Ustilaginsäure-defiziente UV-Mutante MB215Red1 analysiert.

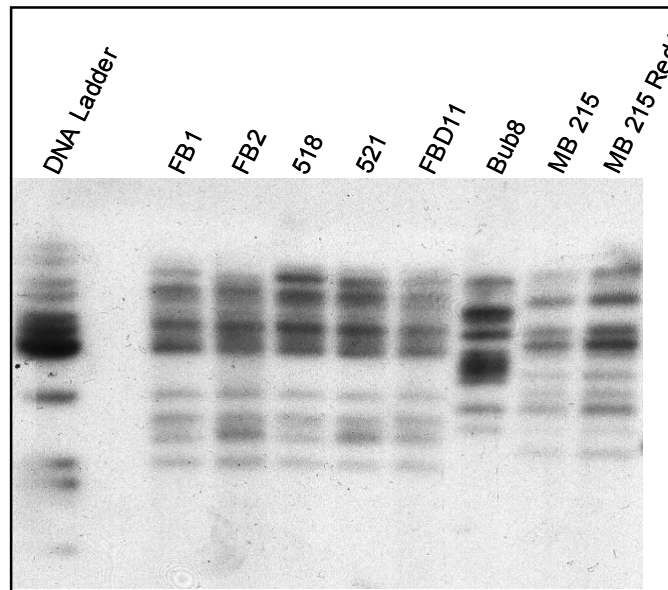


Abbildung 32: Southern Analyse von *red1* in *U. maydis*. 10 µg genomische DNA wurden mit dem Restriktionsenzym PstI verdaut und mit einem 0,8 % Agarosegel aufgetrennt. Als Sonde diente ein EcoRV/PstI-239pb-Fragment aus dem 5'-Bereich des Hobbes-Red1-Retrotransposon-ORF. Die aufgetragenen Stämme sind über den Spuren angegeben.

Die Retrotransposon-Elemente liegen in mindestens 10 bis 15-facher Kopienzahl vor. In der Southern-Analyse sieht man sehr deutlich stammspezifische Unterschiede. Die Stämme MB215 und die UV-Mutante KJ215Red1 weisen das gleiche Bandenmuster auf. Auch die Stämme FB1, Fb2, FBD11 und deren Ursprungsstämme 518 und 521 haben sehr ähnliche Bandenmuster. Das Wildisolat Bub8 zeigt wiederum ein ganz anderes Bandenmuster als die Stämme FB1 oder MB215. Woher die großen Unterschiede der Lage der Retrotransposons im Genom der unterschiedlichen *U. maydis*-Stämme rühren und ob diese eine Auswirkung auf die Ustilaginsäure-Produktion hat, konnte in dieser Arbeit nicht bearbeitet werden. Es deutet aber darauf hin, dass es starke Unterschiede bezüglich der Lage von Retrotransposons im Genom von *U. maydis* vorhanden sind. Zudem zeigt es, dass sich die Lage der

Retrotransposons nicht verändert hat, seitdem die Stämme FB1 und FB2 aus den Stämmen 521 und 518 generiert wurden (Banuett and Herskowitz, 1989).

3. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die biologische Funktion der Ustilaginsäure aufzuklären, die unter Stickstoffmangelbedingungen in großen Mengen von *U. maydis* sekretiert wird. Die Ustilaginsäure ist ein Glykolipid, das aus einer Cellobiose-Einheit mit zwei Glukoseanteilen und aus einer gesättigten Fettsäure besteht. Die Ustilaginsäure besitzt aufgrund ihrer amphipathischen Struktur eine starke Oberflächenaktivität und könnte eine Vielzahl von Funktionen in der Umgebung von *U. maydis* ausüben. Um diese aufzuklären, sollte versucht werden eine Mutante zu erhalten, die nicht mehr in der Lage ist Ustilaginsäure zu produzieren. Dann wäre es möglich den Phänotyp einer solchen Mutante zu bestimmen und Kompetitionsexperimente mit WT-Stämmen durchzuführen. Um diese Ustilaginsäure defiziente Mutante zu erhalten, standen mehrer Möglichkeiten zur Verfügung. Zunächst sollte versucht werden, über einen biochemischen Ansatz ein Schlüsselenzym der Ustilaginsäure-Biosynthese zu identifizieren. Ausgehend von der Proteinsequenz sollte das entsprechende Gen identifiziert werden, um dann mit Hilfe einer gerichteten Mutagenese dieses Schlüsselenzym auszuschalten und eine Ustilaginsäure-defiziente Mutante herzustellen. In einem zweiten Ansatz sollte versucht werden an der Ustilaginsäure-Biosynthese beteiligte Enzyme über einen revers-genetischen Ansatz zu identifizieren. Hierzu sollten konservierte Domänen von Glykosyltransferasen anderer Mikroorganismen als Grundlage zur Suche dienen.

Ein weiterer Ansatz ist der klassisch genetische Ansatz, wo mit Hilfe eines Plattentests Ustilaginsäure defiziente UV-Mutanten gefunden werden sollten. Die UV-Mutaten sollten dann mit Hilfe einer Genbank komplementiert und die entsprechenden Gene identifiziert werden.

3.1 Ustilaginsäure

Die Ustilaginsäure stellt unter den bisher bekannten von Mikroorganismen ausgeschiedenen Glykolipiden eine ungewöhnliche Verbindung dar. Sowohl der Zuckeranteil als auch die hydroxyfettsäure wurden bisher nur in der Ustilaginsäure gefunden. Die bisher bekannten Glykolipide haben Rhamnose-, Sophorose- oder Trehalose- Zuckeranteile (Desai and Banat, 1997). Die Ustilaginsäure wird in großen Mengen ausgeschieden und gilt aufgrund ihrer amphipatischen Struktur als starkes Detergenz. Ustilaginsäure-Produktion konnte bisher nur in *U. maydis* beobachtet werden.

3.1.1 Ustilaginsäureproduktion

U. maydis sezerniert unter Stickstofflimitierten Bedingungen grosse Mengen an Glykolipiden. Die Zusammensetzung der Glykolipide variiert je nach Medienauswahl. So produziert *U. maydis* in Glukose-haltigem Medium zum größten Teil Ustilaginsäure, während in Medium mit Pflanzenöl als Kohlenstoffquelle zum größten Teil die Mannosyl-Erythritol-lipide produziert werden.

Die Produktion von Mannosyl-Erythritollipiden wurde auch in dem Pflanzenpathogenen Pilz *Schizonella melanogramma*, bei *Candida antarctica* und *Geotrichum candidum* einem Humanpathogenen Pilz, beobachtet. Die Mannosyl-Erythritollipid Produktion ist jedoch bei diesen Organismen nicht abhängig von Stickstofflimitierten Bedingungen, sondern findet auch in Vollmedium statt.

Ustilaginsäureproduktion konnte bisher in allen untersuchten *U. maydis*-Stämmen beobachtet werden. Dabei fällt auf, dass Wildisolate schneller mit der Ustilaginsäure-Produktion beginnen und mehr Ustilaginsäure bilden als die untersuchten Laborstämme.

Es könnte sein, dass die Ustilaginsäure eine biologische Funktion während des haploiden Stadiums hat, da sonst zu erwarten wäre, dass einige *U. maydis*-Stämme die Fähigkeit Ustilaginsäure zu produzieren, verloren hätten. Da die Laborstämme in der Regel nur geringer Mengen an Ustilaginsäure produzieren könnte die Ustilaginsäure eine biologische Funktion haben, die bei Laborstämmen keine wichtige Rolle mehr spielt.

3.1.2 Biologische Funktion der Ustilaginsäure

Es können drei mögliche Funktionen der Ustilaginsäure diskutiert werden. Die eine ist die antibiotische Wirkung der Ustilaginsäure, die *U. maydis* helfen könnte, andere Mikroorganismen, die den gleichen Lebensraum besiedeln, zu schwächen bzw. im Wachstum zu unterdrücken. Es konnte gezeigt werden, dass eine Vielzahl von Pilzen durch die Ustilaginsäure im Wachstum inhibiert werden, wie z.B. *Penicillium sp.*, *Thielaviopsis basicola*, *Claviceps purpurea*, *Rhizoctonia solani* und *Aspergillus niger*. Die Ustilaginsäure ist auch wirksam gegen Bodenbakterien wie *Streptomyces sp.*, *Xanthomonas campestris*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus pyogenes*. Diese stehen in direkter Konkurrenz zu dem vermutlich saprophytisch im Boden wachsenden *U. maydis* (Haskins and Thorn, 1951).

Die zweite mögliche Funktion der Ustilaginsäure könnte in ihrer amphipatischen Eigenschaft begründet sein. Die Blattoberfläche der Maispflanze besitzt eine wachsartige Kutikula. Durch ihre amphipatische Wirkung könnte die Ustilaginsäure es *U. maydis* ermöglichen sich an der Blattoberfläche anzuhaften, so dass es dem Pilz erleichtert wird, diese zu durchdringen und in die Pflanze einzudringen. Außerdem wird dadurch auch vermieden, dass die Pilzzellen vom Regen abgespült werden.

Als dritte Möglichkeit könnte die Ustilaginsäure aber auch die Solubilisation der von *U. maydis* ausgeschiedenen hydrophoben Pheromone ermöglichen (Spellig *et al.*, 1994). Dies würde die Diffusion der hydrophoben farnesylierten Pheromone erleichtern. Die Pheromone würden sich dann in einer zweidimensionalen Diffusion an der Grenzfläche zwischen dem hydrophoben Wachs der Blattoberfläche und dem Wasser bewegen. So zeigten Versuche auf dunklen wasserhaltigen Agarplatten, dass gereinigte Ustilaginsäure die Oberflächenspannung in kürzester Zeit herabsetzt und die Agarplatte innerhalb von 30 Minuten mit einem dünnen Film überzieht

3.2 Glukosyltransferase als Schlüsselenzym der Ustilaginsäure-Biosynthese

Ein entscheidender Biosyntheseschritt bei der Ustilaginsäure Produktion könnte die Herstellung der Bindung zwischen dem Zuckeranteil und dem Lipidanteil sein. Glykosyltransferasen katalysieren diese Reaktion zwischen dem Zuckeranteil und dem Lipidanteil von Glykolipiden. Dabei bezeichnet der Name Glykosyltransferasen alle Enzyme, die den Transfer einer Zuckereinheit von einem aktivierten Donormolekül auf einen

spezifischen Akzeptor katalysieren, wobei eine glykosidische Bindung entsteht (Campbell *et al.*, 1997). Als Glukosyltransferasen werden jene Transferasen bezeichnet, die an der Reaktion eines Glukoseanteils mit einem weiteren Molekül beteiligt sind, in Analogie hierzu werden die Rhamnose übertragenden Transferasen Rhamnosyltransferasen genannt. In einigen bakteriellen Systemen konnte die Biosynthese von Glykolipiden bereits auf molekularer Ebene aufgeklärt werden. So wurde für die Rhamnolipide aus *P. aeruginosa* der rhlABR-Gencluster identifiziert, der neben anderen Enzymen auch für zwei Rhamnosyltransferasen kodiert, die die Bindung zwischen der Rhamnose und dem Lipid bzw. zwischen den beiden Rhamnose-Einheiten katalysieren. Aus Bakterien ist eine Vielzahl von Glykosyltransferasen bekannt, die die glykosidische Bindung zwischen einem aktivierten Zucker und einem Lipid herstellen (Bourne and Henrissat, 2001). Die bekanntesten Beispiele sind das bereits erwähnte Rhamnoselipid aus *P. aeruginosa*, bei dessen Synthese Rhamnosyltransferasen beteiligt sind und ein Trehaloselipid, das von *Rhodococcus erythropolis* ausgeschieden wird (Rosenberg and Ron, 1999). Die an der Trehaloselipid-Synthese beteiligten Glykosyltransferasen sind bisher nicht isoliert worden. Es gibt kein Beispiel einer bakteriellen Glukosyltransferase, die Glukose als Substrat für ein ausgeschiedenes Glukolipid verwendet.

In Pilzen und Hefen ist bisher wenig bekannt über Glykosyltransferasen, die an der Produktion eines ausgeschiedenen Glykolipids beteiligt sind. Eine partielle Reinigung und biochemische Charakterisierung gelang bisher nur für eine Glukosyltransferase aus *Candida bogoriensis* (Esders and Light, 1972), die an der Produktion eines Sophoroselipids beteiligt ist. Zur Identifizierung der Glukosyltransferase wurde ein Enzymassay verwandt, indem radioaktiv markierte UDP-Glukose und die Fettsäure als Substrate eingesetzt wurden. Aufgrund der Veränderung der chemischen Eigenschaften der Glukose durch das Anhängen des Lipidanteils konnte die Reinigung des aktiven Enzyms verfolgt werden. Durch die radioaktive Markierung konnte sie detektiert werden (Breithaupt and Light, 1982).

3.2.1 Nachweis der Ustilinsäure-abhängigen Glukosyltransferase

Die Struktur der Ustilaginsäure legt nahe, dass eine spezifische Glukosyltransferase an der Bildung dieses Glykolipids beteiligt ist. Diese müsste spezifisch sein für die aktivierte Glukose und für die Fettsäure der Ustilaginsäure, die Ustilinsäure. Aufgrund des prognostizierten ähnlichen Reaktionsmechanismus wurde ein Enzymassay mit UDP-Glukose und Ustilinsäure als Substraten in Anlehnung an das Protokoll von Breithaupt und Light

(1982) durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass eine Ustilinsäure-abhängige Glukosyltransferase-Aktivität gemessen werden konnte, die so spezifisch ist, dass die Substrate 16-Hexadekansäure, dass sich durch die fehlende Hydroxylgruppe am C15-Atom und 1, 2-Hexadekandiol, dass sich durch die fehlende Säuregruppe von der Ustilinsäure unterscheidet, nicht umgesetzt werden.

Mit Hilfe des Enzymassays gelang eine partielle Aufreinigung der Ustilinsäure-abhängigen Glukosyltransferase auf einer Anionenaustauschsäule. Weitere Reinigungsschritte gelangen jedoch nicht, da das Enzym an Aktivität verlor. Worauf der Aktivitätsverlust zurückzuführen ist, konnte nicht aufgeklärt werden. In den einzelnen Reinigungsschritten stellte sich jedoch heraus, dass es sich bei der Glukosyltransferase vermutlich um ein membrangebundenes Protein handelt. Für membrangebundene Proteine ist bekannt, dass sie häufig inaktiviert werden, wenn sie aus der Membran herausgelöst werden und so ihre Konfiguration verlieren (Lodish *et al.*, 1996). Die enzymatische Aktivität der Glukosyltransferase konnte jedoch mit dem nicht-ionischen Detergenz Triton X-100 stabilisiert werden. So war die Glukosyltransferase auch nach dem Herauslösen aus der Membran noch aktiv. Ein weiterer Grund zur Inaktivierung eines Enzyms kann in der Oxidation des Proteins bestehen. Dies könnte den Aktivitätsverlust durch lange Behandlungsprozeduren erklären. Durch Zugabe von DTT als Antioxiationsmittel sollte dem entgegen gewirkt werden. Es könnte aber sein, dass dieser Oxidationsschutz nicht ausreichend war. Weiterhin könnte sein, dass ein zur Reaktion benötigter Kofaktor bei nachfolgenden Behandlungen entfernt wurde. Die Ustilinsäure-abhängige UDP-Glukosyltransferase Aktivität könnte auch in einem Komplex vorliegen, der aufgrund der Reinigungsschritte zerfällt und somit nicht mehr aktiv ist. Dabei könnte es auch sein, dass dieser Komplex durch Oxidation zerfällt und das Enzym auf diese Weise seine Aktivität verliert.

3.2.2 Revers genetischer Ansatz zur Identifizierung der Ustilinsäure-abhängigen Glukosyltransferase

Aus dem biochemischen Ansatz war nun bekannt, dass in *U. maydis* eine Ustilinsäure-abhängigen Glukosyltransferase vorhanden ist, die vermutlich Schlüsselenzym in der Ustilaginsäure-Biosynthese darstellt. Da es nicht gelang, sie auf biochemischem Wege zu isolieren, sollte versucht werden, sie in einem revers-genetischen Ansatz zu identifizieren. Aufgrund der starken Divergenz der Glukosyltransferasen, die sich auch in hochspezifischen katalytischen Eigenschaften widerspiegelt, ist es schwierig Sequenzhomologien bei

Glukosyltransferasen zu finden. Eine Einteilung der Glykosyltransferasen erfolgt bisher nur bezüglich ihrer Funktion. Dabei scheint der Reaktionsmechanismus der verschiedenen Glykosyltransferasen ähnlich zu sein, was sich in dem ähnlichen Protein-Aufbau einzelner Gruppen der Glykosyltransferasen widerspiegelt (Bourne and Henrissat, 2001). Auf der DNA-Sequenz Ebene sind sie nur wenig konserviert. Die Divergenz der Glykosyltransferasen untereinander lässt sich dadurch erklären, dass es sich um Enzyme handelt, die Substratspezifisch sind und deshalb mit jedem Substrat variieren. Das heißt, dass auch die Erkennung und die Umsetzung, an der sowohl das Donor-, wie auch das Akzeptor-Molekül sowie die katalytische Domäne des Enzyms beteiligt sind, spezifisch sind (Kapitonov and Yu, 1999). Es wird angenommen, dass einzigartige Domänenstrukturen zur Substraterkennung und Nukleotidbindung in dem Enzym vorhanden sind. So wurden Sequenzmotive der UDP-Glukose-Bindungsdomäne identifiziert, die als Erkennungssequenz für Glukosyltransferasen dienen könnte. Durch einen Proteinvergleich von Sterolglukosyltransferasen aus Hefen und Pilzen sowie Pflanzen war es möglich, Oligonukleotidprimer aus einer potentiellen UDP-Glukose-Bindungsdomäne für einen revers-genetischen Ansatz herzuleiten (Warnecke *et al.*, 1999). In diesem Vergleich zeigte sich dass eine Signatur-Sequenz der Protein Superfamilie von UDP-Glykosyltransferasen im C-terminalen Bereich der Proteine konserviert war. Die Sterolglukosyltransferasen sollten sich auch deshalb zur Generierung von Primern eignen, da die produzierten Sterolglukoside Glukolipide sind. Außerdem handelte es sich bei *S. cerevisiae*, *C. albicans* und *P. pastoris* um mit *U. maydis* verwandte Organismen, was die Suche ebenfalls erleichtern könnte. Im Sequenzvergleich zeigt sich, dass der C-Terminus konservierte Domänen beinhaltet, wohingegen der N-Terminus nicht konserviert ist (Warnecke *et al.*, 1999). Die für die Superfamilie von UDP-Glykosyltransferasen charakteristische Signatur-Sequenz wurde als Grundlage für die Suche nach Glukosyltransferasen in *U. maydis* herangezogen. Da davon ausgegangen werden musste, dass mit den degenerierten Primer der UDP-Glukose-Bindungs-Domäne eine Vielzahl von Sequenzen amplifiziert werden, die UDP-Glukose als Substrat verwenden, sollte die Suche weiter eingegrenzt werden. Deshalb wurde in dem revers-genetischen Ansatz RNA verwendet, die unter Ustilaginsäure-produzierenden, wie auch unter nicht-produzierenden Bedingungen isoliert wurde. Die PCR-Reaktionen der unterschiedlichen RNAs wiesen unterschiedliche Bandenmuster auf. Bei der Analyse der PCR-Amplifikate wurden besonders die Banden beachtet, die nur unter Ustilaginsäure-produzierenden Bedingungen exprimiert wurden. Somit konnte eine Anreicherung derjenigen Glykosyltransferasen erreicht werden, die nur unter Ustilaginsäure-produzierenden Bedingungen exprimiert werden. Es muss aber

bemerkt werden, dass es sich bei den Ustilaginsäure-produzierenden Bedingungen um stickstofflimitierte Bedingungen handelt, die eine Vielzahl an Veränderungen auch im allgemeinen Stoffwechsel der *U. maydis* Zellen bewirken.

Es konnte eine 8-Amino 7-Oxonanoatsynthase-Sequenz identifiziert werden, die eindeutig dem Biotinsyntheseweg zugeordnet werden konnte (Streit and Entcheva, 2003). Außerdem konnte die γ -Untereinheit eines Oligosaccharid-transferaseglykoproteins gefunden werden, das eindeutig der Glykoproteinsynthese zugeordnet werden konnte. Eine potentielle Cellulosesynthase wurde identifiziert, die die Reaktion zwischen zwei Zuckereinheiten katalysiert. Sie könnte als Enzym in Frage kommen, die die Bindung zwischen den zwei Glukoseeinheiten der Ustilaginsäure herstellt. Sie wurde aber sowohl unter Ustilaginsäure-produzierenden und als auch unter nicht-produzierenden Bedingungen exprimiert, sodass davon ausgegangen werden musste, dass es sich nicht um ein für die Ustilaginsäure-Biosynthese spezifisches Protein handelt.

Weiter konnte ein Fragment isoliert werden, das Homologie zu Sterolglukosyltransferasen zeigte und nur unter Ustilaginsäure-produzierenden Bedingungen amplifiziert wurde. Da die Deletion dieses Gens die Ustilaginsäure-Produktion nicht veränderte, muss jedoch davon ausgegangen werden, dass es nicht an der Ustilaginsäure-Biosynthese beteiligt ist. Unabhängig davon wurde diese Sterolglukosyltransferase auch von D. Warnecke (Hamburg) identifiziert. In dieser Arbeit wurde auch eine zweite Glukosyltransferase isoliert, die eine grosse Ähnlichkeit zu der von mir isolierten Glukosyltransferase aufweist (pers. Mitteilung D. Warnecke). Deshalb bestand die Möglichkeit, dass diese zweite Glukosyltransferase an der Ustilaginsäure Synthese beteiligt ist. Die zur Verfügung gestellten Doppeldeletionsmutanten produzierten jedoch ebenfalls weiterhin Ustilaginsäure, weshalb davon ausgegangen werden muss, dass diese Sterolglukosyltransferasen nicht in Verbindung zur Ustilaginsäure-Biosynthese stehen. Weshalb die Sterolglukosyltransferase verstärkt unter Stickstoffmangel-Bedingungen exprimiert wird, wurde nicht geklärt. Sterol-Glukoside stellen für eukaryotische Membranen typische membran-gebundene Lipide da, die die physikalischen Eigenschaften der Membran beeinflussen. Die Produktion der Ustilaginsäure könnte aufgrund der amphiphilen Eigenschaft der Ustilaginsäure eine Veränderung der Membran-Eigenschaften von *U. maydis* erfordern und somit die erhöhte Expression der Sterolglukosyltransferasen erklären.

3.3 Klassisch Genetischer Ansatz

3.3.1 Isolierung von Ustilaginsäure defizienten UV-Mutanten

Um durch ungerichtete Mutagenese hergestellte Ustilaginsäure-Mutanten selektionieren zu können, musste zuerst eine Detektionsmethode gefunden werden, mit der diese von den Ustilaginsäure-Produzenten zu unterscheiden waren. Im Wesentlichen sind zwei Platten-Detektionsverfahren bekannt, mit deren Hilfe Glykolipid-Produzierende Mikroorganismen isoliert werden können. Das eine Verfahren beruht auf der Komplexbildung von CTAB mit dem Glykolipid, dass mit Hilfe eines Farbstoffes visualisiert wird (Siegmund and Wagner, 1991). Das zweite ist für Biodetergenz-produzierende Bakterien entwickelt und beruht auf der hämolytischen Aktivität von Detergentien, wodurch ein Hämolysering um Biodetergenz-produzierende Bakterien entsteht (Carillo *et al.*, 1996).

Die Versuche mit CTAB/Methylenblau-Agarplatten zeigten, dass gereinigte Ustilaginsäure einen dunklen Ring um die Auftragstelle bildete. *U. maydis* war aber nicht in der Lage ist, auf diesem Medium zu wachsen. Die Variation mit anderen Farbstoffen zeigte keine Veränderung im Wachstumsverhalten. Da *U. maydis* bei verringerter CTAB-Konzentration geringes Wachstum zeigt, muß man davon ausgehen, dass CTAB wachstumshemmend auf *U. maydis* Zellen ist. CTAB ist ein starkes Detergenz, das in der Lage ist, Zellwände anzugreifen. Um die bei geringer CTAB-Konzentration langsam wachsenden Kolonien ist kein deutlicher Ring zu erkennen, was entweder auf die geringe CTAB-Konzentration oder auch auf die geringe Ustilaginsäure-Produktion auf diesen Platten zurückgeführt werden kann. Erstaunlich ist, dass die Detektion von durch *U. maydis* ausgeschiedenen Glykolipiden explizit in der Veröffentlichung von Siegmund und Wagner (1991) erwähnt wurde. Die CTAB-Agarplatten konnten also nicht zur Detektion von Ustilaginsäure-defizienten *U. maydis* Mutanten verwendet werden.

Die andere Detektionsmethode für Biodetergenz-produzierende Bakterien beruht auf der hämolytischen Wirkung von Detergentien. Aufgrund der Oberflächenaktivität von Detergentien platzen die Erythrozyten, was auf Blutagarplatten als Hämolyse sichtbar wird. So konnten Biodetergenz-produzierende Bakterien auf Blutplatten isoliert werden (Carillo *et al.*, 1996). Es gibt Hinweise, dass auch Ustilaginsäure hämolysierend auf die osmotisch empfindlichen Blutzellen wirkt (Lin, 1996). Um zu zeigen, dass Ustilaginsäure hämolytisch aktiv ist, wurde gereinigte Ustilaginsäure auf eine Blutagarplatte aufgetragen. Nach wenigen Stunden war ein deutlicher Hämolysering um die aufgetragene Ustilaginsäure entstanden. Ebenfalls zeigten *U. maydis* Zellen starke hämolytische Aktivität. Die Stärke der Hämolyse

korreliert mit der Ustilaginsäure-Produktion der einzelnen Stämme. So zeigt das Wildisolat MB215 starke Hämolyse, wohingegen die Laborstämme FB1 und FB2, die weniger und langsamer Ustilaginsäure produzieren, weniger hämolytische Aktivität zeigen. Zusätzlich wurden zwei UV-Mutanten isoliert, die stark verzögert Hämolyse zeigen und auch verzögert Ustilaginsäure produzieren. Ob die hämolysierenden Eigenschaften von *U. maydis* aber nur auf der Ustilaginsäure-Produktion beruhen oder ob *U. maydis* zusätzlich hämolysierende Enzyme ausscheidet, konnte nicht geklärt werden. So mussten z.B. 30.000 UV-Mutanten auf ihre hämolysierenden Eigenschaften untersucht werden, um eine UV-Mutante zu finden, die nicht mehr in der Lage ist, Ustilaginsäure zu produzieren. Diese UV-Mutante zeigte keine Hämolyse mehr und wurde aufgrund dessen, dass die Blutagarplatten rot blieben Red1 genannt. Sie hatte aber einen pleiotrophen Phänotyp. Sie produzierte zum einen keine Ustilaginsäure mehr, zum anderen waren die Zellen aber auch stark geschwollen. *U. maydis* hat ca. 7500 Gene (Brachmann, 2001). Man geht davon aus, dass man jedes Gen eines Organismus mindestens einmal trifft, wenn man die dreifache Menge an Mutanten produziert und analysiert. Das bedeutet, dass theoretisch ca. 22000 UV-Mutanten untersucht werden müssten um ein Gen zu finden, dass an der Ustilaginsäure-Produktion beteiligt ist. An der Ustilaginsäure-Biosynthese müsste mehr als ein Gen beteiligt sein, dass spezifisch nur für diesen Stoffwechselweg benötigt wird. So müsste es mindestens ein spezifisches Enzym zur Biosynthese der Ustilinsäure und das Gen der Glukosyltransferase in *U. maydis* geben. Ausgehend davon, dass für die Ustilaginsäure-Produktion mehr als ein spezifisches Enzym benötigt ist die eine gefundene UV-Mutanten, die keine Ustilaginsäure mehr produziert, sehr wenig. Dies spricht dafür, dass eventuell mehrere Substanzen unabhängig voneinander für die hämolytische Wirkung verantwortlich sind. Der pleiotrope Phänotyp der UV-Mutante MB215Red1 könnte ein Hinweis darauf sein, dass mehrere Gene oder grundlegende Eigenschaften im Stoffwechsel durch die UV-Mutation betroffen sind. Das heißt, es ist nicht sicher, ob durch die UV-Mutation nicht mehrere Gene beeinflusst, die getrennt voneinander den hämolytischen Effekt von *U. maydis* bewirken. Das wiederum bedeutet, dass die Blutagarplatten eventuell nur bedingt zur Selektion von Ustilaginsäure-produzierenden *U. maydis*-Stämmen geeignet sind.

Allerdings verhielt sich die Mutation in einem Kreuzungsexperiment wie ein einzelner Genort. Zusätzlich muss als Argument gegen die Hypothese der mehrfachen hämolytischen Eigenschaften von *U. maydis* vorweggenommen werden, dass die UV-Mutation durch ein DNA-Fragment in beiden Effekten, sowohl der Ustilaginsäure-Produktion als auch dem geschwollenen Phänotyp, komplementiert werden kann.

3.3.2 Analyse der UV-Mutante Red1

Um die UV-Mutante MB215Red1 zu analysieren, wurde sie mit einer *U. maydis*-Cosmidbank transformiert. Hierbei fanden sich drei Cosmide, die die UV-Mutante MB215Red1 komplementierten, von denen eines ausgewählt und sequenziert wurde. Interessanterweise enthielt dieses Cosmid anstatt des erwarteten 40 kb Inserts nur ein 8 kb Insert. In dieser Sequenz fanden sich zwei offene Leserahmen, von denen einer für einen pilzliche Transkriptionsfaktor kodiert, der Ähnlichkeiten zu AmyR, einem Transkriptionsaktivator des Amylose-Stoffwechsels in *Aspergillus niger* aufweist. Während der zweite für ein Gag-Pol-Polypeptid eines Retrotransposons kodiert. Durch Herstellung einer Deletionsmutante konnte gezeigt werden, dass die Ustilaginsäure-Produktion durch das Entfernen des AmyR-Gens nicht beeinflusst ist. Damit lag nahe, dass das Retrotransposon für die Komplementation verantwortlich ist. Dieselbe Sequenz konnte unabhängig aus einer genomischen Plasmidbank isoliert werden. Dabei enthielt der Plasmidklon drei vollständige „long terminal repeats“ (LTR), wobei das eine im 5' Bereich des Retrotransposons und die zwei anderen im 3' Bereich des LTR lagen (Abbildung 29). Der letzte LTR lag in umgekehrter Orientierung zum vorhergehenden vor. Durch Subklonierungen und mit Hilfe von PCR-Fragmenten konnte eine 483 bp lange DNA-Sequenz des Retrotransposons identifiziert werden, das die UV-Mutation komplementiert. In den 483 bp befinden sich 247 bp des LTR-Bereiches des Retrotransposons Red1 und 236 bp des N-terminalen Bereichs des Gag/Pol Polyprotein-ORF. Obwohl das Genom von *U. maydis* ca. 23 hochverwandte Retrotransposon bzw. Retrotransposonfragmente enthält, deren Sequenzunterschiede untereinander sehr gering sind, scheint nur eines dieser *hobS*-homologen Retrotransposons in der Lage zu sein, die UV-Mutation zu komplementieren. Das Retrotransposon Red1 zeigt hohe Sequenzhomologien zu dem *hobS*-Elemente aus *U. maydis*, das von O. Ladendorf identifiziert wurde. Im Folgenden wird es als *hobS*-homologes Retrotransposon bezeichnet.

3.3.3 Retrotransposons in *U. maydis*

Das Retrotransposon-Element, welches bei der Komplementation isoliert wurde, ist aufgrund seiner Sequenz in die Gruppe der Ty1/*copia*-ähnlichen Klasse I-Transposons einzuordnen. Das Retroelement enthält einen einzelnen langen offenen Leserahmen dessen Domänenstruktur ebenfalls zeigt, dass es sich um ein Ty1/*copia* Klasse I-Transposon handelt. In diesem Transposon befinden sich die Integrase-Domäne N-terminal vor der RNaseH-

Domäne, während diese Domäne in Ty3/ *gypsy*-Elementen und in Retroviren in umgekehrter Reihenfolge vorliegt (Kim *et al.*, 1998).

Die LTR-Strukturen des von O. Ladendorf isolierten *hobS*-Elementes entsprechen strukturell dem Retrovirus-Paradigma (Modrow and Falke, 1997). Sie enthalten sowohl putative Promotorelemente (CAAT- und TATA-Boxen), als auch Terminator- bzw. Polyadenylierungssignale in Form AT-reicher Abschnitte. Für *hobS* gelang auch die Identifizierung einer putativen Primerbindungsstelle (PBS), die von einer der vier *U. maydis* Methionin-tRNAs gebunden werden kann. Die Elemente der Ty1/*copia*-Gruppe setzen fast ausnahmslos tRNA^{Met}-Spezies zur Initiierung der Minus-Strang DNA-Synthese ein (Voytas and Boeke, 1993), andere Retrotransposons und Retroviren greifen aber auf unterschiedliche tRNA-Typen zurück (Modrow and Falke, 1997; Voytas and Boeke, 1993). So könnte es auch sein, dass ein Sequenzbereich im 5'-Bereich des Elementes Homologie zu einer anderen bzw. einer genomischen bisher nicht identifizierten tRNA-Spezies aufweist. In den LTRs von *hobS* sind vier Repetitionen eines 24mer Sequenzmotivs vorhanden. Die Repetitionen in LTRs von Retroviren beinhalten vielfach Enhancer Strukturen oder fungieren als Enhancer-Elemente (Fan, 1990; Scheef *et al.*, 2001). Dies könnte also ein Hinweis darauf sein, dass in den *hobS*-LTRs ein Enhancer-Element enthalten ist. Die Repetitionen könnten aber auch eine Akkumulation *cis*-aktiver Bindestellen für Transkriptionsfaktoren darstellen (Modrow and Falke, 1997).

Bisher ist es nicht gelungen, neue Insertionsereignisse der *hobS*-Retrotransposons nachzuweisen, obwohl es eine Vielzahl von Hinweisen gibt, dass diese Elemente noch aktiv sein könnten. Ein Hinweis hierauf geben die direkten Repetitionen, die sich in den flankierenden Bereichen finden. Wie die meisten Retrotransposons, weisen auch die *hobS*-Elemente 5 bp lange Zielsequenzduplikationen auf, die auf den Integrationsmechanismus retrotransposomaler Integrasen hinweisen und als ein wichtiger Indikator für die Integrität und Aktivität von Retrotransposons gelten (Hamann *et al.*, 2000; Sandmeyer *et al.*, 1990).

3.3.4 In Ustilaginsäure defizienten Mutanten wird das *hobS*-homologe Retrotransposon exprimiert

Kreuzungsanalysen von Red1 ergaben, dass die ursprüngliche UV-Mutation zusammen mit dem *b*-Paarungstyp segregiert. Der *b*-Kreuzungstyp liegt auf dem Chromosom 1, auf dem sich in der veröffentlichten Sequenz nur ein LTR, aber nicht der Retrotransposon ORF eines Retrotransposons befindet. Die Entfernung zwischen dem Retrotransposon-Element und dem

b-mating Type beträgt jedoch ca. 1 Mb, was eine Kosegregation der beiden Genloci unwahrscheinlich macht. Das heisst, dass der Phänotyp von MB215Red1 vermutlich nicht auf eine Mutation in einer Kopie des Retrotransposons selbst zurückzuführen ist. Damit ergibt sich die Frage, wodurch der beobachtete pleiotrope Phänotyp bewirkt wird und wieso das Einbringen von Red1 zu einer Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps führt.

Northern-Analysen der UV-Mutante MB215Red1 haben gezeigt, dass in diesem Stamm ein Volllängentranskript des *hobS*-homologen Retrotransposons exprimiert wird. Im Ausgangstamm und auch in den getesteten Laborstämmen wird dagegen keine Expression des Retrotransposons beobachtet. Das Einbringen des komplementierenden Cosmids führt dagegen wieder zur Unterdrückung der Expression des Retrotransposon ORFs in den Mutanten.

Damit ergibt sich die Möglichkeit, dass die Expression des vollständigen Transkripts zu dem beobachteten Phänotyp führt (Abbildung 31). Es stellt sich dann die Frage, was die Expression des Retrotransposons bewirkt. Die Anwesenheit eines Volllängentranskripts könnte auf eine Aktivierung des Retrotransposons hindeuten, die zu unkontrollierten Insertionen im Genom führen könnte, was sowohl zu dem morphologischen Phänotyp und als auch zum Verlust der Produktion des Sekundärmetaboliten Ustilaginsäure führt. Ebenso könnte es aber auch sein, dass die Expression des Polyproteins selber oder die enthaltenen Teilproteine wie z.B. das Capsidprotein, das Nukleinsäurebinde-Protein, die Protease, die Integrase, die reverse Transkriptase und/oder die RNaseH eine schädliche Wirkung in *U. maydis* bewirkt. In jedem Falle müsste in *U. maydis* ein Mechanismus vorhanden sein, der normalerweise die Expression des Retrotransposon-ORFs verhindert. Die Regulation der Retrotransposon-Aktivität in *U. maydis* ist bisher nicht aufgeklärt. Es könnte jedoch sein, dass die UV-Mutante in diesem Mechanismus defekt ist.

3.3.5 Regulation der Retrotransposons

Es fällt auf, dass Retrotransposons sehr häufig in der Nähe von Centromeren zu finden sind. In diesem Bereich beobachtet man eine Unterdrückung der Transkriptionsaktivität. Auch für *U. maydis* wird angenommen, dass sich die Retrotransposons oder Fragmente von Retrotransposons vorwiegend in diesen Abschnitten des Genoms angesammelt haben, da dort eine schädigende Wirkung von aktiven Retrotransposons verhindert wird (O. Ladendorf, pers. Mitteilung). In der Mutante könnte nun eine Komponente des zellulären Mechanismus betroffen sein, der an der Unterdrückung der Transkription der Retroelemente beteiligt ist. Es

ist denkbar, dass die Anzahl der in den Zellen vorhandenen Kopien ausschlaggebend für die Repression der Transkription ist. Sollte in der Mutante die Wahrnehmung der Kopienzahl teilweise gestört sein, könnte das Einbringen zusätzlicher Kopien auf einem autonom replizierenden Plasmid den ursprünglichen Zustand wiederherstellen. Die Eingrenzung der supprimierenden Aktivität auf einen kleinen Bereich im 5' Bereich des ORF deutet darauf hin, dass dort eine Sequenz liegt, die für die Wahrnehmung der Kopienzahl dieses Retrotransposons durch die Zellen verantwortlich ist.

Eine solche Beeinflussung der Genaktivität könnte auf einem RNA vermittelten Mechanismus beruhen, wie er auch bei der Heterochromatinbildung beobachtet wird. In *S. pombe* konnte gezeigt werden, dass die LTRs von Retroelementen auf diese Weise in die Gen-Regulation während der Zell-Differenzierung eingreifen. Diese Regulation der die LTRs umgebenden Gene ist jedoch unterbunden, wenn die für den RNAi Mechanismus benötigten Proteine nicht vorhanden sind (Schramke and Allshire, 2003). Die RNAi Maschinerie wird auch für die normale Centromer-Funktion und die Heterochromatinbildung in diesem Bereich benötigt (Volpe *et al.*, 2003). Auch in *S. pombe* sind im Bereich der Centromere eine Anhäufung von Retrotransposon-Elementen bzw. LTRs zu beobachten. Von der Regulation durch die Heterochromatinbildung in der Umgebung der repetitiven Elemente im Centromerbereich sind Gene betroffen, deren Promotoren in einem Bereich von 7 kb liegen. Gene die weiter als 10 kb entfernt liegen sind nicht mehr betroffen (Matzke and Matzke, 2003).

Ein Teilstück des LTR des *hobS*-ähnlichen Retrotransposon könnte sich also regulatorisch auf die Transkription des Retrotransposon-ORF auswirken, indem sie als Signal dient, um die Expression der Gene des Retrotransposons auszuschalten. Es konnte jedoch bis jetzt in der Sequenzdatenbank von *U. maydis* kein Homolog zu den Genen gefunden werden, die in *S. pombe* an der RNAi-Maschinerie beteiligt sind. Es wurde keine Sequenzähnlichkeit zu den entsprechenden Proteinen Dicer, Argonaut, RdRP (RNA dependent RNA Polymerase) und auch nicht zu Swi6 gefunden. Untersuchungen zur Regulation der Expression des *U. maydis* Gens Pyr3 durch antisense RNA ergaben, dass diese keinen Einfluss auf die Expression von Pyr3 hat, was ebenfalls ein Hinweis auf das Fehlen von RNAi-Aktivität in *U. maydis* ist (Keon *et al.*, 1999).

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass in *U. maydis* eventuell ein bisher unbekannter Mechanismus der Expressions-Regulation auf RNA-Ebene existiert. Es wäre interessant, durch gezielte Experimente Komponenten zu isolieren, die an dieser Regulation beteiligt sind.

3.4 Ausblick

Um die Funktion der Ustilaginsäure genauer bestimmen zu können, müssen zwei *U. maydis*-Stämme mit unterschiedlichem Paarungstyp generiert werden, die keine Glykolipide mehr produzieren. Die Funktion der Ustilaginsäure für das Wachstum von *U. maydis* im Boden bzw. die antibiotische Wirkung der Ustilaginsäure auf die Mikroorganismen im ökologischen Umfeld von *U. maydis* könnten durch Kompetitionsexperimente untersucht werden. Dabei könnten Wachstumsraten Ustilaginsäure produzierender und Ustilaginsäure defizienter Stämme miteinander verglichen werden.

Außerdem kann mit zwei *U. maydis*-Stämme unterschiedlichen Paarungstyps, die nicht mehr in der Lage sind, Ustilaginsäure zu produzieren, untersucht werden, ob die Ustilaginsäure benötigt wird, um die Pheromoneerkennung zu erleichtern.

Um weitere Ustilaginsäure-defizienten *U. maydis*-Stämme zu erhalten, sollten deshalb sowohl weitere UV-Mutanten gesucht werden als auch die Suche nach potentiellen Kandidatengenomen, die an der Ustilaginsäure-Biosynthese beteiligt sind. Hierzu sollte die Suche nach der Ustilinsäure abhängigen Glukosyltransferase zählen. Die Freigabe der *U. maydis*-Sequenz ermöglicht die Suche nach Glykosyltransferasen *in silico*, wodurch eine Vielzahl von möglichen Enzymen untersucht werden können.

Zur Suche nach Ustilaginsäure-defizienten UV-Mutanten sollte nach weiteren Detektionsverfahren gesucht werden, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass die auf Blutagarplatten beobachtete Hämolyse auf zwei unabhängigen Funktionen von *U. maydis* beruhen.

4. Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Medien, Lösungen, Enzyme und Kits

Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien waren p. a. Qualität.

Acrylamid Rotiphorese Gel 30 (40:1) (Roth)	Dinatriumhydrogenphosphat (Roth)
Agar-Agar (Roth)	Dithiothreitol (Roth)
Agarose (PEQLAB)	Eisen[III]chlorid (Merck)
Aktivkohle (Sigma)	Essigsäure (Roth)
Ammoniumacetat (Roth)	Ethanol (Roth)
Ammoniumpersulfat (Roth)	Ethidiumbromid (Sigma)
Ammoniumsulfat (Roth)	Glukose (Roth)
Ampicillin (Roth)	Glycerin (87%) (Roth)
Bacto Agar (BD)	Hygromycin B (Invitrogen)
Bacto Pepton (BD)	Isopropanol (Roth)
Bacto Yeast Extract (BD)	Kaliumchlorid (Roth)
Borsäure (Roth)	Kaliumdihydrogenphosphat (Roth)
β -Mercaptoethanol (Sigma)	Methanol (Roth)
Bromphenolblau (Roth)	Magnesiumchlorid (I.T. Baker)
Calciumchlorid (Merck)	Magnesiumsulfat (Merck)
Casamino Acids (BD)	MOPS (Sigma)
Carboxin (Sigma)	Natriumacetat (Merck)
Chloramphenicol (Sigma)	Natriumchlorid (Roth)
Chloroform (Roth)	Natriumcitrat (Merck)
Desoxyribonukleotid-Triphosphate (dATP,CTP, dGTP, dTTP) (Roth)	Natriumdihydrogenphosphat (Roth)
	Natrium-EDTA (Merck)
	Natriumhydroxid (Roth)

Natriumsulfat (Roth)	Tris-HCl (Sigma)
Paraffin flüssig (Merck)	Trypton (Difco)
Phenol (Roth)	Uracil (Calbiochem)
Polyethylenglycol (PEG 4000)(Sigma)	Wasser (Braun)
Potato Dextrose Broth (BD)	X-Gal (Sigma)
Raffinose (Fluka)	Xylencyanol FF (BioRad)
Saccharose (Roth)	Yeast Extract (Difco)
Salzsäure (Roth)	Yeast Nitrogen Base (Difco)
SDS (Roth)	Zinkchlorid (Merck)
Sorbitol (Sigma)	Zitronensäure (Merck)
Triton X-100 (Sigma)	
Tris-Base (Sigma)	

Puffer und Lösungen

Standard-Puffer und -Lösungen wurden nach (Ausubel *et al.*, 1987) und nach (Sambrook *et al.*, 1989) hergestellt.

AE-Puffer:

50 mM Na-Acetat, pH 5,3
10 mM Na₂-EDTA in H₂O_{bid.}

AE-PC:

50% AE-Phenol (s. u.)
50% Chloroform

Alkalische Phosphatase-Puffer (10×):

10 mM ZnCl₂
10 mM MgCl₂
100 mM Tris-HCl, pH 8,3
in H₂O_{bid.}

Ampicillin-Lösung:

10 mg/ml Ampicillin
in H₂O_{bid.}, sterilfiltriert

Carboxin-Lösung:

5 mg/ml Carboxin
in Methanol, sterilfiltriert

Coomassie-Protein-Färbelösung:

0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250
45% (v/v) Methanol
10% (v/v) Essigsäure
in H₂O_{bid.}

Coomassie-Färbelösung:

0,25% (w/v) Coomassie Blue R-250
10% (v/v) Essigsäure
in H₂O_{bid.}

Coomassie-Entfärber:

45% (v/v) Methanol
10% (v/v) Essigsäure
in H₂O_{bid.}

Denaturierender RNA Auftragspuffer (6x)

0,25% (w/v) Bromphenolblau
0,25% (w/v) Xylencyanol FF
10 mM Na₂-EDTA, pH 8,0
in Formamid

DENAT:

1,5 M NaCl
0,4 M NaOH
in H₂O

DNA-Auftragspuffer (6x):

50% (w/v) Sucrose
0,2% (w/v) Orange G
1mM EDTA

Entwickler-Lösung:

2,5% Na₂CO₃
0,02% Formaldehyd
in H₂O_{bidest.}

Fixierlösung

30% Ethanol
10% Essigsäure konz.
in H₂O_{bid.}

Hygromycin B-Lösung:

50 mg/ml Hygromycin B
in H₂O_{bid.}, sterilfiltriert

Klenow-Puffer (10x):

100 mM MgCl₂
500 mM Tris-HCl, pH 7,5
in H₂O_{bid.}

Ligase-Puffer (10x):

50 mM MgCl₂
660 mM Tris-HCl, pH 7,5
10 mM DTT
10 mM ATP
in H₂O_{bid.}

Lysozym-Lösung:

10 mg/ml Lysozym
10 mM Tris-HCl, pH 8,0
in H₂O_{bid.}

Minilysat III-Lösung:

3 M Na-Acetat pH 4,8

MOPS-Puffer (10x):

200 mM MOPS, pH 7,0
80 mM Na-Acetat
10 mM Na₂-EDTA
in H₂O_{bid.}

Natriumphosphatpuffer (1 M):

1 M Na₂HPO₄
1 M NaH₂PO₄
pH 7,0

Northern-Hybridisierungspuffer:

50 mM PIPES, pH 6,5
100 mM NaCl
50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0
1 mM EDTA
5% (w/v) SDS
in H₂O_{bid.}

Northern-Waschpuffer:

1× SSC (s. u.)
5% SDS
in H₂O_{bid.}

Novozym-Lösung:

2,5 bis 5 mg/ml Novozym
in H₂O_{bid.}, sterilfiltriert

PC:

50% TE-Phenol (s. u.)
50% Chloroform

PCR-Puffer (10x):

500 mM KCl
200 mM Tris-HCl, pH 8,4
in H₂O_{bid.}

Phenol, alkalisch (TE-Phenol):

DNA-Rotiphenol pH 8,0 (Roth)

Phenol, sauer (AE-Phenol).

RNA-Rotiphenol pH 5,3 (Roth)
Äquilibriert mit 1xAE-Puffer

PBS:

7,9 mM Na₂HPO₄×2H₂O
14,5 mM KH₂PO₄
0,5 mM MgCl₂
2,7 mM KCl
137 mM NaCl
in H₂O_{bid.}
pH-Wert stellt sich auf 7,2 – 7,4 ein

Probenpuffer (6x):

300 mM Tris-HCl, pH 8,0
30% (v/v) Glycerin
20% (w/v) SDS
0,5 g/l Bromphenolblau
15% (v/v) β-Mercaptoethanol (frisch zugeben)
in H₂O_{bid.}

Proteinase-Inhibitoren:

234,4 µg/ml Pefabloc (Roche) oder
1 Tablette/50 ml Complete EDTA-free
(Roche)

Proteingel Entfärb-Lösung:

45% (v/v) Methanol
10% (v/v) Essigsäure
in H₂O_{bid.}

Proteingel-Laufpuffer:

25 mM Tris-HCl, pH 8,8
200 mM Glycin
0,1% (w/v) SDS
in H₂O_{bid.}

Proteinaufnahmepuffer:

0,1M Tris-HCl pH 7,7
0,1 mM DTT
0,2% Triton-X100
Proteinase Inhibitor Cocktail (Sigma) 10 µg/ml

Proteinpuffer:

0,1M Tris-HCl pH 7,7
0,1 mM DTT
1% TritonX100
Proteinase Inhibitor Cocktail (Sigma) 10 µg/ml

Proteingel-Probenpuffer (5x):

60 mM Tris-HCl, pH 6,8
2% (w/v) SDS
14 mM β-Mercaptoethanol
25% (v/v) Glycerin
0,1% (w/v) Bromphenolblau
in H₂O_{bid.}

Proteingellaufpuffer:

25 mM Tris-HCl, pH 8,8
200 mM Glycin
1% (w/v) SDS
in H₂O_{bid.}

RNA-Auftragspuffer:

50% (w/v) Saccharose
0,25% (w/v) Bromphenolblau
0,25% (w/v) Xylencyanol FF
in MOPS-Puffer

RNase A-Lösung:

10 mg/ml RNase A
15 mM NaCl
10 mM Tris-HCl, pH 8,0
in H₂O_{bid.}, 15 min. gekocht

Sammelgel:

125 mM Tris-HCl, pH 6,8
5% (w/v) Acrylamid
0,13% (w/v) Bisacrylamid
0,1% (w/v) SDS
0,1% (w/v) Ammoniumpersulfat
0,1% (v/v) TEMED
in H₂O_{bid.}

SCS:

20 mM Na-Citrat, pH 5,8
1 M Sorbitol
in H₂O_{bid.}, sterilfiltriert

Silber-Lösung:

0,1% AgNO₃
in H₂O_{bidest.}

SM Puffer:

100 mM NaCl
8 mM MgSO₄ x 7H₂O
50 mM Tris-HCl pH 7,5

Southern-Hybridisierungspuffer:

500 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0
7% (w/v) SDS
in H₂O_{bid.}

Southern-Waschpuffer:

100 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0
1% (w/v) SDS
in H₂O_{bid.}

SSC (20x):

300 mM Na-Citrat, pH 7,0
3 M NaCl in H₂O_{bid.}

STC:

10 mM Tris-HCl, pH 7,5
100 mM CaCl₂
1 M Sorbitol
in H₂O_{bid.}, sterilfiltriert

STC/PEG:

15 g STC (s. o.)
10 g PEG 4000, sterilfiltriert

STET:

10 mM Tris-HCl, pH 8,0
100 mM NaCl
1 mM Na₂-EDTA
5% (v/v) Triton X-100
in H₂O_{bid.}

TAE (50x):

2 M Tris-Acetat
100 mM Na₂-EDTA
in H₂O_{bid.}

TBE (5x):

500 mM Tris-Borat, pH 7,9
10 mM Na₂-EDTA
in H₂O_{bid.}

TBS:

50 mM Tris-HCl, pH 7,5
150 mM NaCl
in H₂O_{bid.}

TE (10x):

100 mM Tris-HCl, pH 7,9
10 mM Na₂-EDTA
in H₂O_{bid.}

Trenngel:

375 mM Tris-HCl, pH 8,8
10% bzw. 6% (w/v) Acrylamid
0,27% (w/v) Bisacrylamid
0,1% (w/v) SDS
0,1% (w/v) Ammoniumpersulfat
0,1% (v/v) TEMED
in H₂O_{bid.}

X-Gal-Lösung:

10 mg/ml X-Gal in
Dimethylformamid

Ustilago-Lysispuffer:

2% Triton X100
1% SDS
100 mM NaCl
10 mM Tris-HCl, pH 8,0
1 mM Na₂-EDTA

Medien

Ustilago maydis Medien

Für die Kultivierung von *U. maydis* wurden folgende Medien verwendet:

PD-Blutplatten

24 g Potato Dextrose Broth
20 g Bacto Agar
5 g NaCl
mit H₂O auf 1 l aufgefüllt, pH 6,0 mit 5 M
NaOH eingestellt. Nach Abkühlen auf 38°C
50 ml Schafsblut (Oxoid) unter Rühren
zugeben.

PD-Charcoal-Festmedium:

24 g Potato Dextrose Broth
10 g Charcoal
20 g Bacto Agar
mit H₂O auf 1 l aufgefüllt

MM-Medium (Holliday, 1974):

62,5 ml Salz-Lösung (s.u.)
0,5 ml Spurenelementlösung (s.u.)
20 g Glukose
0,2 g (NH₄)₂SO₄
mit H₂O auf 1 l aufgefüllt

Salz-Lösung (Holliday, 1974):

16 g KH₂PO₄
4 g Na₂SO₄
8 g KCl
4 g MgSO₄ × 7 H₂O
1,32 g CaCl₄ × 2 H₂O
mit H₂O auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert.

Spurenelement-Lösung (Holliday, 1974):

60 mg H₃BO₃
140 mg MnCl₂ × 4 H₂O
400 mg ZnCl₂
40 mg NaMoO₄ × 2 H₂O
100 mg FeCl₃ × 6 H₂O
400 mg CuSO₄ × 5 H₂O
Mit H₂O auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert.

NSY-Glycerin (Einfriermedium):

8 g Nutrient Broth
1 g Yeast Extract
5 g Saccharose
800 ml 87% Glycerin
mit H₂O auf 1 l aufgefüllt
PD-Medium:
24 g Potato Dextrose Broth
20 g Bacto Agar (für Platten)
mit H₂O auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert

Regenerationsagar (Schulz *et al.*, 1990):

a) Top-Agar:
1,5% (w/v) Bacto-Agar
1 M Sorbitol
in YEPS-Medium (s. u.)
b) Bottom-Agar:
wie a), nur zusätzlich 400 µg/ml Hygromycin
oder 4 µg/ml Carboxin

YEPS-Medium (Tsukuda *et al.*, 1988)

10 g Yeast Extract
20 g Pepton
20 g Saccharose
mit H₂O auf 1 l aufgefüllt

YNB-Medium für Ustilaginsäure-Produktion

1,7 g YNB
mit H₂O auf 1 l aufgefüllt und pH 6,0 mit 5M NaOH eingestellt. Nach dem Autoklavieren wurde sterilfiltrierte Glukose f.c. 5% zugegeben.

Alle Medien wurden autoklaviert. Antibiotika wurden, soweit nicht anders vermerkt, in folgenden Konzentrationen zugesetzt: Carboxin (2 µg/ml) und Hygromycin (200 µg/ml).

E.coli Medien

Für die Kultivierung von *E.coli* wurden folgende Medien verwendet:

LB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989):

10 g Trypton
5 g Yeast Extract
10 g NaCl
mit H₂O auf 1 l aufgefüllt

YT-Medium (Sambrook *et al.*, 1989):

8 g Trypton
5 g Yeast Extract
5 g NaCl
mit H₂O auf 1 l aufgefüllt

dYT-Medium (Sambrook *et al.*, 1989):

16 g Trypton
10 g Yeast Extract
5 g NaCl
mit H₂O auf 1 l aufgefüllt

dYT-Glycerin (Sambrook *et al.*, 1989):

10 g Yeast Extract
16 g Trypton
5 g NaCl
800 ml 87% Glycerin
mit H₂O auf 1 l aufgefüllt

Alle Medien wurden autoklaviert. Für die Kultivierung von *E. coli* wurden Medienzusätze, soweit nicht anders vermerkt, in folgenden Konzentrationen zugesetzt: Ampicilin (100 µg/ml) und X-Gal (40µg/ml).

Enzyme

Calf Intestine Alkalische Phosphatase

(NEB)

Lysozym

(Boehringer)

Novozym 234

(Novo Nordisc)

Restriktionsenzyme

(NEB, Amersham,)

Ribonuklease A

(Boehringer)

Ribonuklease H

(NEB)

Shrimp Alkalische Phosphatase

(Amersham)

T4 DNA-Ligase

(Boehringer)

Taq DNA-Polymerase

(Laborpräparation)

Pfu DNA-Polymerase

(Stratagene)

T4 DNA-Polymerase

(USB)

Verwendete Kits und sonstige Materialien

Kits

QIAquick Gel Extraction Kit zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (Qiagen), JETSTAR® (Genomed) zur Plasmid-Maxipräparation, Qiagen PCR Purification Kit (Qiagen) zur Aufreinigung von PCR-Produkten, TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen) zur Klonierung von PCR-Produkten, Megaprime Labeling Kit (Amersham Pharmacia Biotech) zur radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten, MobiSpin® S-200 Säulen (MoBiTec) zur Aufreinigung von radioaktiv markierten DNA-Sonden. Weiteres verwendetes Material ist unter den jeweiligen Methoden beschrieben.

Material

Gel Blotting Papier (Schleicher & Schüll), Glasperlen 150-212 Microns (Sigma), Nylonfilter® Hybond N+ (Amersham Pharmacia Biotech), Petrischalen (Greiner), 15 ml und 50 ml PPN-Röhrchen (Greiner), Sterilfilter 0,20 µm (Sartorius), Thermalpapier (Hitachi), Röntgenfilm Kodak X-omat® (Kodak) und New Medical X-Ray Screen (CEA RP).

DNA-Größenstandards

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurden λ-DNA PstI-Fragmente (Laborpräparate) und der Gene Ruler DNA Ladder Mix (MBI Fermentas) als DNA Größenstandards verwendet:

λ-DNA *PstI*-Fragmente in bp:

11509, 5077, 4749, 4507, 2838, 2560, 2459, 2443, 2130, 1936, 1700, 1159, 1093, 805, 514, 468, 458, 339, 264, 249, 216, 211, 200, 164, 150, 94, 87, 15

Gene Ruler DNA Ladder Mix-Fragmente in bp:

10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, **3000**, 2500, **2000**, 1500, 1200, **1031**, 900, 800, 700, 600, **500**, 400, 300, 200, 100

4.1.2 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von den Firmen ARK Scientific und MWG synthetisiert, die Nukleotidsequenz ist jeweils vom 5'- in Richtung 3'-Ende angegeben.

M 13 fwd

GTA AAA CGA CGG CCA GT

Zur Sequenzierung verwendetes Oligonukleotid, vor dem Poly-Linker von pBS II SK (+), pBS II KS (+), pUC19, pSL1180, pNEB193 und pCR2.1 Topo.

M 13 rev

CAG GAA ACA GCT ATG AC

Hauptsächlich zur Sequenzierung verwendetes Oligonukleotid, hinter dem Poly-Linker von pBS II SK (+), pBS II KS (+), pUC19, pSL1180, pNEB193 und pCR2.1 Topo.

MB 151

GAC TCG AGT CGA CAT CGA (T)¹⁷

Oligo dT-Primer für RACE (Innis et al., 1990)

MB 152

GAC TCG AGT CGA CAT CG Adapter-Primer
passend zu MB 151 für RACE (Innis et al., 1990)

MB 153

GTI CA(C/T) CA(C/T) GGI GG

MB 154

GTI CA(C/T) CA(C/T) GGI GGI (A/T)(G/C)I GGI
AC

MB 155

CCI TT(C/T) TT(C/T) GGI GA(C/T) CA

Degenerierte Oligonukleotide, abgeleitet aus den Peptidsequenzen VHHGG (MB153), VHHGGSGT (MB154) und PFFGDQ (MB155) der Sterolglukosyltransferase Ugt51 aus Hefe.

MB 185

CCA ACG TGG AGT AAG TGA AC

MB 186

GCT CAA CTT TCA TCG TGC CCA

MB 187

CTT GCC AAG GGT CTC TTA GC

MB 188

CTT ATC GCT TGT CGC TCT CA

MB185 - 188: Kontrollprimer für ΔUgt1-Stämme

MB 216

GAA GCG ATG AAA TTG CGG

MB 217

TTA TGT TGG GAC CAT CGC

MB 218

AGT TTT CCG ATT CAG GCG

MB 219

ACT GGA AAA GCT TTG CGC

MB 220

GTA GCT TCC TCA GAT ACT

MB 221

GGA CTT ACG ACA TTG AAC

MB 222

GAC CCC CTT TGA GTG TAC

MB 223

GTG GGA GTG CGG TTG AAG

MB216 – 223: Primerpaare zur Bestimmung der Paarungstypallele a1,a2, b1 und b2

MB 313

CGA GAA CGA ATA CAT GAT G

MB 314

GAA GTC TCC CTT TCC TTA G

Mit MB 313 Primerpaar zur Klonierung und nachfolgender Sequenzierung von pCM54Red1

MB 387

CCC GGG ATC CAG GCT AAA CAC AAA TCG

MB 388

CCC GGG ATC CGT GAA TCG TAA ATC ATG
AGT C

MB 389

CCC GGG ATC CGT TTA GTC TGA TCG CCG
ACA ATC

MB 390

CTG CAG GAT CCT GAC GTA TAG GGA GAA
GCT CAT G

MB 391

CCC GGG ATC CTT AGT AGG GAA TTT GTT G
Reverser Primer mit BamHI-Restriktionsschnittstelle zur Erzeugung von Subklonen unterschiedlicher Länge zusammen mit den Primern MB387 – 390.

4.1.3 Stämme

E. coli-Stämme

Für sämtliche Klonierungen ohne nähere Angaben wurde der Stamm DH5 α (Hanahan, 1985) verwendet, bei dem es sich um ein Derivat des *E. coli*-Stammes K12 mit folgenden genetischen Markern handelt: F⁻, *endA1*, *hsdR*, *hsdM*⁺, *sup44*, *thi-1*, *gyrA1*, *gyrA96*, *relA1*, *recA1*, *lacZ* Δ M15. Für PCR-Klonierungen unter Verwendung des TOPO TA Cloning[®] Kits von Invitrogen wurde der *E. coli*-Stamm TOP10 verwendet: F⁻, *mcrA*, Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*), ϕ 80*lacZ* Δ M15, Δ *lacX*74, *recA1*, *deoR*, *araD*139, Δ (*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL* (Str^R), *endA1*, *nupG*. Die Nomenklatur von *E. coli*-Stämmen richtet sich nach (Demerec *et al.*, 1966).

U. maydis-Stämme

Tabelle 2: Ausgangsstämme

Stamm	Genotyp	Resistenz	Referenz
FB1	<i>a1 b1</i>	-	(Banuett and Herskowitz, 1989)
FB2	<i>a2 b2</i>	-	(Banuett and Herskowitz, 1989)
MB 215	<i>a2 b13</i>	-	M. Bölker, pers. Mitteilung
2 C I 2	<i>a1 b1 Δugt1 Δugt2</i>	Hyg, Cbx	C. Basse, pers. Mitteilung
1 C III 2	<i>a2b2 Δugt1 Δugt2</i>	Hyg, Cbx	C. Basse, pers. Mitteilung

Tabelle 3: In dieser Arbeit hergestellte Stämme

Stamm	Genotyp	Resistenz	Vorläufer, Plasmid
MB215 Δ ugt1 #3 und #4	<i>a2 b13 Δugt1 ::Hyg</i>	Hyg, Orientierung A	MB 215, ugt1 deletiert mit pKJ61 Δ ugt1
MB215 Δ ugt1 #13 und #14	<i>a2 b13 Δugt1 ::Hyg</i>	Hyg, Orientierung B	MB 215, ugt1 deletiert mit pKJ61 Δ ugt1
MB215Red1	<i>a2 b13</i>		UV-Mutante von MB215

Sämtliche Transformanden wurden durch Southern-Analysen bestätigt.

4.1.4 Plasmide, Genbanken und Plasmidkonstruktionen

Sämtliche Plasmide tragen eine Ampicillin-Resistenzkassette zur Selektion in *E. coli*. Alle Klonierungsschritte wurden durch Restriktionsanalyse überprüft, alle eingebrachten PCR-Amplifikate wurden sequenziert.

Ausgangsplasmide

pBS II KS (+) (Stratagene)

Klonierungsvektor, Blau/Weiß-Selektion ist möglich.

pBS II SK (+) (Stratagene)

Klonierungsvektor, Blau/Weiß-Selektion ist möglich.

pUC18 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985)

Klonierungsvektor, Blau/Weiß-Selektion ist möglich.

pCR2.1-Topo (Invitrogen)

Vektor zur Klonierung von PCR-Produkten mittels Topoisomerase-Aktivität. Die entsprechenden PCR-Produkte können mit *EcoRI* wieder ausgeschnitten werden; Blau/Weiß-Selektion ist möglich.

pCM54 (Tsukuda *et al.*, 1988)

Ist ein frei replizierendes Plasmid, das eine Hygromycin-B Resistenzkassette und eine UARS ("*Ustilago* autonomously replicating sequence") enthält.

pHLN4H (Bölker, pers. Mitteilung)

pUC 12 Derivat, enthält eine Hyg^R-Kassette, die mit *PvuII* ausgeschnitten werden kann.

pNEBUC (Weinzierl *et al.*, 2001)

Enthält die Cbx^R-Kassette als *NotI*-Fragment und eine UARS („*Ustilago* autonomously replicating sequence“).

pNEBUH (Weinzierl *et al.*, 2001)

Enthält die Hyg^R-Kassette als *NotI*-Fragment und eine UARS („*Ustilago* autonomously replicating sequence“).

pCR-ppi1 (C.Basse, pers. Mitteilung)

Enthält ein mit *EcoRI* zu isolierendes 430 bp-Fragment, aus dem ORF des konstitutiv exprimierten Gens für die Peptidyl Prolyl, *cis-trans* Isomerase (ppi1).

Genbanken

Cosmidbank pUMcos^x (Bölker et al., 1995a)

Cosmidbank des *U. maydis*-Stammes FBD11 (*a1a2 b1b2*), erzeugt durch Ligation partiell geschnittener *MboI*-Fragmente in die *BamHI*-Schnittstelle des Vektors pUMcos. pUMcos ist ein Derivat des Vektors pScos1 (Stratagene), in dem ein *BglII/HindIII*-Fragment, das die Neomycin-Resistenzkassette enthält, durch ein *EcoRV/SmaI*-Fragment aus dem Vektor pCBX122, das die Carboxin-Resistenzkassette enthält, ausgetauscht wurde.

Frei replizierende Cosmidbank pSCos

UARS Cbx hergestellt im Labor von M. Bölker Juni 2000

Cosmidbank des *U. maydis*-Stammes FBD11 (*a1a2 b1b2*), erzeugt durch Ligation partiell restringierter *MboI*-Fragmente in die *BamHI*-Schnittstelle des frei replizierenden Vektors pUMcos. pUMcos^{x2} ist von pUMcos^x abgeleitet und enthält eine UARS Sequenz (G. Weinzierl).

λgt10 cDNA-Bank (Schauwecker et al., 1995)

cDNA-Bank des Stammes FBD11 (*a1 a2 b1 b2*) nach Wachstum auf aktivkohlehaltigem Vollmedium.

Freireplizierende cDNA-Bank (G. Weinzierl, pers. Mitteilung)

Freireplizierende cDNA-Bank einer Kreuzung der Stämme FB1 (*a1 b1*) und FB2 (*a2 b2*) nach Wachstum auf aktivkohlehaltigem Vollmedium (für 12, 24 und 48 Stunden). Erstellt in Anlehnung an den cDNA Library Kit von Clontech.

Genomische pCM54 Plasmidbank

(Bauchwitz and Holloman, 1990)

8 kb Fragmente genomischer *U. maydis* DNA wurden in die *BamHI* Schnittstelle von pCM54 (s. o.) ligiert

In dieser Arbeit hergestellte Plasmide

*Subklone von *ugt1**

pKJ1

Ein mit Hilfe von RACE (Primer MB152 und MB 154) amplifiziertes 700 bp Fragment aus cDNA, die aus RNA Ustilaginsäure-produzierender *U. maydis* Zellen (MB 215) generiert wurde, kloniert in den Vektor pBS II KS (+)

pKJ2 – pKJ4

Subklone von *ugt1* in pBS II SK(+) aus dem Cosmid 2G6. pKJ2 (3,0 kb *PstI*-Fragment), pKJ3 (1,3 kb *BamHI*-Fragment), pKJ4 (1,4 kb *EcoRI*-Fragment) siehe Abb.1 Ergebnisse.

pKJ5

Subklon von *ugt1* in pBS II KS(+) aus dem Cosmid 41F4. Das 5,2 kb *PstI*-Fragment enthält den ganzen *ugt1*-ORF (4656 bp) Abb.1 Ergebnisse.

*Plasmide zur Kartierung und Sequenzierung von *ugt1**

Die Plasmide stellen Subklone des 5,2 kb *PstI*-Fragment des Vektors pKJ5 und des 3,3 kb *PstI* Fragment des Vektors pKJ2 dar.

pKJ6 – 9

Subklone von *ugt1* aus pKJ2 in pUC18. **pKJ6** (850 bp *EcoRI*-Fragment) siehe Abb.1, Ergebnisse, **pKJ7** (700 bp *BamHI*-Fragment), **pKJ8** (750 bp *EcoRI*-Fragment), **pKJ9** (650 bp *BamHI*-Fragment).

pKJ10 – 15

Subklone von *ugt1* aus pKJ5 und pKJ10 in pBS II KS (+). **pKJ10** (2,2 kb *BamHI*-Fragment), **pKJ11** (1,4 kb *XhoI/BamHI*-Fragment), **pKJ12** (250 bp *XhoI*-Fragment), **pKJ13** (600 bp *BamHI/XhoI*-Fragment), **pKJ14** (1,2kb *EcoRV*-Fragment) und **pKJ15** (1,2kb *HindIII*-Fragment) siehe alle Abb.1 Ergebnisse.

*Plasmide zur Kartierung und Sequenzierung von *pScosRed1**

Die Plasmide stellen Subklone von *red1* abgeleitet von pSCosRed1 dar. Folgende Subfragmente wurden in pBS II KS (+) kloniert.

2,2 kb *NotI*: **pKJ16**, 7,5 kb *NotI*: **pKJ17**, 8 kb *NotI/XhoI*: **pKJ18**, 1,4 kb *NotI/XhoI*: **pKJ19**, 1,2 kb *Sall*: **pKJ20**, 2,5 kb *Sall*: **pKJ21**, 0,6 kb *Sall*: **pKJ22**, 1,1 kb *Sall*: **pKJ23**, 0,4 kb *Sall*: **pKJ24**, 2,8 kb *Sall*: **pKJ25**, 1,7 kb *PstI*: **pKJ26**, 1,6 kb *EcoRV/XhoI*: **pKJ30**, 3,0 kb *EcoRV/SmaI*: **pKJ31**, 2,1 kb *BamHI*: **pKJ32** und 1,7 kb *EcoRI*: **pKJ33**. Die Plasmide pKJ 27 – 28 wurden aus pKJ26 in pBS IKS (+) subkloniert: 0,7 kb *PstI/SacII*: **pKJ27**, 0,4 kb *SacII*: **pKJ28**, für **pKJ29** wurde pKJ26 mit *PstI/SacII* geschnitten und religiert. Siehe Abb.2 Ergebnisse.

Plasmide zur Kartierung und Sequenzierung von pCM54Red1

Die Plasmide stellen Subklone von *red1* abgeleitet von pCM54Red1 dar. Folgende Subfragmente wurden in pBS II KS (+) kloniert.

1,6 kb *BamHI/Sall*: **pKJ34**, 1,2 kb *Sall*: **pKJ35**, 0,5 kb *EcoRI/Sall*: **pKJ36**, 2,5 kb *Sall/BamHI*: **pKJ37**, 4,0 kb *BamHI/EcoRI*: **pKJ38**, 0,9 kb *EcoRI*: **pKJ39**, 5,0 kb *EcoRI/BamHI*: **pKJ40**, 2,5 kb *BamHI/PstI*: **pKJ41**, 0,6 kb *Sall/PstI*: **pKJ42**, 6,0 kb *PstI/BamHI*: **pKJ43**, 3,8 kb *BamHI/HindIII*: **pKJ44**, 3,0 kb *SmaI/BamHI*: **pKJ45**, 2,0 kb *Sall/XbaI*: **pKJ46**, 2,0 kb *NotI*: **pKJ47**. Siehe Abb.3 **pKJ48**: Aus dem Vektor pCM54Red1 wurde ein 1,1kb PCR-Fragment mit den Primern MB313/MB314 amplifiziert in pCR2.1-Topo kloniert. Siehe Abb.3, Ergebnisse.

Deletionskonstrukte von pScosRed1

Für die folgenden Deletionskonstrukte wurde pScosRed1 mit Restriktionsenzymen geschnitten und das Restcosmid religiert.

pKJ49: Aus dem Vektor pScosRed1 wurde ein 3 kb *EcoRV/SmaI* Fragment über einen Restriktionsverdau entfernt und die beiden stumpfen Enden religiert. Siehe Abb.23, Ergebnisse

pKJ50: Aus dem Vektor pScosRed1 wurde ein 6,2 kb *KpnI* Fragment über einen Restriktionsverdau entfernt und der Restvektor religiert. Siehe Abb.23, Ergebnisse.

Deletionskonstrukte von pCM54Red1

Für die folgenden Deletionskonstrukte wurde pCM54Red1 mit Restriktionsenzymen geschnitten, mit einer „Klenow-Fill-In“-Reaktion der überhängenden Enden aufgefüllt und das Restplasmid religiert. Die entfernten Fragmente sind beschrieben.

pKJ51: 5,9 kb *SacI/NotI* Fragment, **pKJ52**: 5,0 kb *SacI/KpnI* Fragment, **pKJ53**: 3,9 kb *SacI/BamHI* Fragment, **pKJ54**: *SacI/EcoRV* Fragment, **pKJ55**: 2,0 kb *BamHI/NotI* Fragment, **pKJ56**: 3,9 kb *EcoRV/NotI* Fragment.

pKJ57: 3,9 kb AflIII Fragment, „Klenow-Fill-In“-Reaktion wurde nicht benötigt.

Klonierung von red1-Teilstücken in pCM54 über PCR-Amplifikate

MB215Red1 komplementierende pCM54 Plasmide wurden über Klonierung von *Bam*HI geschnittenen PCR-Produkte in den pCM54 Vektor hergestellt. Die Kontrolle, dass die PCR-Produkte mit *Bam*HI geschnitten waren, wurde durch Zwischenklonierung in den Vektor pCR2.1-Topo und folgende BamHI-Restriktion sichergestellt.

pKJ58: 2,0 kb PCR-Produkt, mit den Primern MB387/391 amplifiziert, **pKJ59:** 1,5 kb PCR-Produkt, mit den Primern MB388/391 amplifiziert, **pKJ60:** 1,0 kb PCR-Produkt, mit den Primern MB389/391 amplifiziert, **pKJ61:** 0,5 kb PCR-Produkt, mit den Primern MB390/391 amplifiziert. Siehe Abb.28, Ergebnisse.

ugt1-Deletionskonstrukte

pKJ61Δugt1

Mit diesem Konstrukt wird ein 700 bp *Bam*HI-Fragment im *ugt1*-ORF von der Position +3106 bis Position +3785 gegen die Hyg^R ersetzt. In den Vektor pKJ10 wurde das 1,4 kb *Eco*RI-Fragment aus pKJ4 in die *Eco*RI-Schnittstelle der Multiple Cloning Side (MCS) kloniert und mit Hilfe von *Pst*I-Restriktionsverdau wurde die Orientierung überprüft. In die zwischen dem 2,2 kb *Bam*HI-Fragment und 1,4 *Eco*RI-Fragment liegenden *Sma*I Restriktionsschnittstelle wurde eine 2,9 kb Hygromycin B Resistenzkassette kloniert. Die Hygromycin B Resistenzkassette wurde mit *Pvu*II aus dem Vektor pHLN4H isoliert.

Die Orientierung, in der die Hygromycin B Resistenzkassette in das Konstrukt kloniert wurde, wurde mit einem *Eco*RI-Restriktionsverdau überprüft. Der ORF der Hygromycin B Resistenzkassette liegt sowohl in gleicher Leserichtung (A) wie der ORF von *ugt1*, als auch in entgegengesetzter Richtung vor (B).

Die Konstrukte wurden zur Transformation mit einem *Not*I-Restriktionsverdau linearisiert.

4.2 Mikrobiologische, zellbiologische und genetische Methoden

4.2.1 *Escherichia coli*

E. coli-Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 180 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 37°C kultiviert. Übernachtskulturen wurden von YT-Amp Festmedien angeimpft. Die bei -80°C gelagerten Glycerinkulturen wurden vor weiteren Arbeiten immer zuerst auf YT-Amp Festmedien ausgestrichen.

Bestimmung der Zelldichte bei *E. coli*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Uvikon 860 Spektrometer (Kontron Instruments) bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der OD₆₀₀ die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,8 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD₆₀₀ des jeweiligen Kulturmediums verwendet. OD₆₀₀ 1,0 entspricht etwa 10⁹ Zellen/ml.

Herstellung und Transformation von *E. coli* Ca²⁺- kompetenten Zellen

Dieses Protokoll ist modifiziert nach (Cohen *et al.*, 1972). Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterienzellen wurden 100 ml LB-Medium 1:100 mit einer frischen DH5α- oder Top10-Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ 0,5 bei 37°C und 200 Upm inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren für 10 min bei 4.000 Upm und 4°C (Heraeus Megafuge 1,0R) pelletiert und in 400 ml eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert. Die Suspension wurde für 10 min bei 4.000 Upm und 4°C (Heraeus Megafuge 1,0R) pelletiert und in 2,5 ml 50 mM CaCl₂ Lösung + 15% Glycerin resuspendiert. Die Suspension wurde zu je 100 µl aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, jeweils 50 µl mit 5 µl Plasmidlösung (1-5 ng Plasmid) bzw. Ligationsansatz versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 1 min bei 42°C wurde der Transformations-Ansatz zur phänotypischen Expression der durch das eingebrachte Plasmid vermittelten Antibiotikaresistenz mit 800 µl dYT-Medium versetzt und 30 min bei 1400 Upm. und 37°C in einem Eppendorf-Wärmeblock inkubiert. 200 µl des Transformations-Ansatzes wurde auf YT-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Auf diese Weise konnte eine Transformationsrate von 10⁶ Transformanten pro 1 µg eingesetzter superhelikaler Plasmid-DNA erreicht werden.

4.2.2 *Ustilago maydis*

Kultivierung von *Ustilago maydis*

U. maydis-Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 180 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 28°C kultiviert, sofern nicht anders vermerkt. Übernachtskulturen wurden von Kulturen auf Festmedien, die weniger als einen Monat bei 4°C gelagert wurden, angeimpft. Die bei -80°C gelagerten Glycerinkulturen wurden vor weiteren Arbeiten immer zuerst auf Festmedien ausgestrichen.

Bestimmung der Zelldichte bei *Ustilago maydis*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Uvikon 860 Spektrometer (Kontron Instruments) bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der OD₆₀₀ die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,8 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD₆₀₀ des jeweiligen Kulturmediums verwendet. OD₆₀₀ = 1,0 entspricht etwa $1-5 \times 10^7$ Zellen/ml.

Transformation von *Ustilago maydis*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach (Schulz *et al.*, 1990) und (Gillissen *et al.*, 1992). Von einer auf Platte wachsenden Kultur wurde eine 4 ml YEPS-Flüssigkultur angesetzt und für 8-10 h bei 28°C geschüttelt. Diese Vorkultur wurde anschließend 1/300 in 50 ml frischem YEPS-Medium verdünnt und bei 28°C bis zu einer Zelldichte von $1,2 \times 10^7$ Zellen/ml (bis maximal OD₆₀₀ = 1,0) geschüttelt. Nach Erreichen des optimalen Zelltiters wurden die Zellen durch Zentrifugieren (3.200 Upm, 10 min, 4°C, Heraeus Megafuge 1,0R) geerntet, einmal mit 25 ml SCS gewaschen und in 1 ml SCS mit 3 mg/ml Novozym resuspendiert. Die in diesem Puffer bei Raumtemperatur ablaufende Protoplastierung kann mikroskopisch verfolgt werden, da die zigarrenförmigen Zellen nach Lyse der Zellwand eine kugelige Form einnehmen. Nach vollständiger Protoplastierung (10-40 min) wurden 10 ml SCS zugegeben und die Protoplasten durch 10-minütige Zentrifugation bei 2.300 Upm (4°C, Heraeus Megafuge 1,0R) pelletiert. Um das Novozym vollständig zu entfernen, wurde dieser Waschgang dreimal wiederholt. Anschließend wurde mit 10 ml STC gewaschen und das Pellet danach in einem Volumen von 0,5 ml eiskaltem STC aufgenommen. Die so behandelten Protoplasten können 3-4 h auf Eis oder aliquotiert bei -80°C mehrere Monate aufbewahrt werden.

Zur integrativen Transformation wurden 50 µl Protoplasten mit 1-5 µl linearisierter Plasmid-DNA (ca. 5 µg) für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml STC/PEG folgte eine weitere Inkubation von 15 min auf Eis. Anschließend wurde der gesamte Transformationsansatz auf einer kurz zuvor mit Top-Agar überschichteten Regenerationsagarplatte ausgestrichen. Nach 2 bis 5 Tagen Inkubation bei 28°C wurden die gewachsenen Kolonien mit Zahnstochern auf antibiotikumhaltigen PD-Platten, vereinzelt. Potentielle Transformanten wurden zum Teil mittels PCR vorselektioniert und abschließend durch Southern-Blot Analysen verifiziert. Die Stämme wurden vor weiteren Experimenten insgesamt dreimal vereinzelt.

Kreuzungsversuche bzw. Test auf filamentöses Wachstum

U. maydis-Stämme wurden von Platte in YEPS-Flüssigmedium inokuliert. Bei 28°C wurden die Zellen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-1,0 inkubiert. Die Zellen wurden geerntet (Zentrifugieren bei 3.500 Upm für 7 min bei RT in der Heraeus Megafuge 1,0R) und das Pellet anschließend in H₂O_{bid.} so aufgenommen, dass die Zelldichte bei etwa OD₆₀₀ = 5,0 lag. Bei Kreuzungen wurden gleiche Volumina der jeweiligen Kreuzungspartner in einem Eppendorf-Gefäß miteinander gemischt. Von jedem Ansatz wurden 3 µl auf

eine PD-Charcoal-Platte getropft. Die Platte wurde für 24 h bei 21°C unter Luftabschluss inkubiert. Anschließend wurde der Kreuzungsversuch anhand der Filamentbildung ausgewertet.

Test auf Pathogenität

Um *U. maydis*-Stämme auf Pathogenität zu testen, wurden mit in Flüssigkultur über Nacht angezogenen Zellen in 7-8 Tage alte Maispflanzen (Varietät Early Golden Bantam, Olds Seed Company, Madison, WI) inokuliert. Die Maispflanzen wurden im Gewächshaus unter kontrollierten Bedingungen (14 h bei 28°C, 10 h bei 18°C) gezüchtet. Die Bonitur erfolgte nach 7 und 21 Tagen (Gillissen *et al.*, 1992).

Sporulation und Segregationsanalyse

Von den infizierten Pflanzen wurden Tumore abgeschnitten und etwa eine Woche bei 37°C getrocknet. Teliosporen aus getrockneten Tumoren wurden direkt auf 2% igem Wasseragar (20 g Agar-Agar auf 1 l H₂O_{bidest}) ausgestrichen und für 18h bei 28°C inkubiert. Auskeimende Teliosporen wurden unter dem Binokular Stemi SV6 (Zeiss) isoliert und auf PD-Festmedium plattiert. Weitere Vereinzelungsschritte erfolgten ebenfalls auf PD-Festmedium.

Mikroskopie und Bildverarbeitung

Die zellmorphologische Betrachtung von *U. maydis* erfolgte an einem Lichtmikroskop (Axiophot, ZEISS) mittels Nomarski-Optik. Digitale Aufnahmen mit einer hochauflösenden CCD-Kamera (C4742-25, Hamamatsu) aufgenommen und als TIFF-Dateien für die weitere Bearbeitung in dem Programm PHOTOSHOP 5.5 (Adobe) abgespeichert.

4.3 Molekularbiologische Standardmethoden

Standardtechniken sind ausführlich bei (Sambrook *et al.*, 1989) beschrieben. Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bei einer wellenlänge von $\lambda = 260$ nm bestimmt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht $OD_{260} = 1$ einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 33 µg/ml einzelsträngiger DNA, bzw. 40 µg/ml RNA. Als Maß für die Reinheit der Desoxyribonukleinsäuren diente der Quotient aus OD_{260} zu OD_{280} . Für reine DNA und RNA sollte er bei etwa 1,8 liegen. Niedrigere Werte weisen auf Verunreinigungen mit Proteinen hin, höhere Werte auf Verunreinigungen mit Salzen oder Zuckern. Die Messungen erfolgten im Uvikon 860 Spektrometer (Kontron Instruments).

4.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren

Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung erfolgte durch "Lyse durch Kochen" nach (Sambrook *et al.*, 1989). 1,5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur wurden pelletiert (14.000 Upm, 30 sec, RT, Heraeus Biofuge Pico). Das Zellpellet wurde in 350 µl STET resuspendiert, nach Zugabe von 25 µl Lysozym-Lösung kräftig geschüttelt, 5 min bei RT inkubiert und anschließend 40 sec bei 95°C in einem Eppendorf-Heizblock inkubiert. Die lysierten Zellen und die denaturierte genomische DNA wurden 10 min bei 14.000 Upm abzentrifugiert (Heraeus Biofuge Pico) und dieses Pellet danach mit einem sterilen Zahnstocher aus der wässrigen Lösung entfernt. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte durch Fällung mit 40 µl 3 M Na-Acetat, pH 5,3 und 400 µl Isopropanol bei RT für 5 min und anschließender Zentrifugation für 5 min bei 14.000 Upm (Heraeus Biofuge Pico). Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und nach Trocknen in 30 µl TE-Puffer mit 20 µg/ml RNase A aufgenommen. Mit dieser Methode gelang es, aus 1,5 ml Übernachtskultur etwa 50 µg Plasmid-DNA zu isolieren.

DNA-Isolierung aus *Ustilago maydis*

Diese Methode ist modifiziert nach (Hoffman and Winston, 1987). Dabei wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur in YEPS-Flüssigmedium zusammen mit 0,3 g Glasperlen in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pelletiert (14.000 Upm, 30 sec, RT, Heraeus Biofuge Pico), der Überstand abgegossen und das Pellet in 400 µl Ustilago-Lysispuffer und 400 µl TE-Phenol/Chloroform aufgenommen. Die Proben wurden für 10 min auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA) geschüttelt. Nach Phasentrennung (14.000 Upm, 5 min, RT, Heraeus Biofuge Pico) wurden 400 µl des Überstands in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 1 ml Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation (14.000 Upm, 30 sec, RT, Heraeus Biofuge Pico) wurde das Pellet in 50 µl TE mit 20 µg/ml RNase A aufgenommen, bei 50°C resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt.

RNA-Isolierung aus *Ustilago maydis*-Flüssigkulturen

Diese Methode ist modifiziert nach (Schmitt *et al.*, 1990). Zellen von einer frisch ausgestrichenen Platte wurden aus einer Vorkultur in 20 ml Medium angeimpft und bis OD₆₀₀ 0,5 bei 28°C und 200 Upm inkubiert. 15 ml dieser Kultur wurden abzentrifugiert (3.000 Upm, 10 min, RT, Heraeus Megafuge 1,0R) und das Pellet in 500 µl AE-Puffer mit 1% (w/v) SDS resuspendiert. Anschließend wurden 500 µl AE-Phenol zugegeben und die Probe 20 sec kräftig geschüttelt. Der Zellaufschluss erfolgte bei 65°C für 4 min unter ständigem Schütteln (Eppendorf Thermomixer). Im Anschluss daran wurde die Probe auf -80°C abgekühlt, bis sich Phenolkristalle bildeten (etwa 4 min). Nach Phasentrennung durch Zentrifugieren (14.000 Upm, 10 min, 4°C, Heraeus Biofuge Pico) wurde die obere wässrige Phase, welche die RNA enthält, in ein neues Gefäß überführt. Es folgte eine Extraktion mit 500 µl AE-Phenol/Chloroform. Die wässrige RNA-Lösung (400 µl) wurde danach mit 40 µl 3 M Na-Acetat pH 5,3 versetzt und mit 1 ml Ethanol gefällt (1 h bei -20°C). Nach Zentrifugation (14.000 Upm, 30 min, RT, Heraeus Biofuge Pico) wurde die RNA mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet, in 20 µl H₂O_{bid.} oder

RNA-Lagerpuffer aufgenommen und bei -80°C aufbewahrt. Zur Kontrolle und Konzentrationsabschätzung wurde $1\ \mu\text{l}$ auf einem 1%igen TAE-Agarosegel analysiert und photometrisch bei 260 nm gemessen.

Fällung von DNA

Die Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen erfolgte durch Fällung. Hierzu wurde die Probe mit 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat pH 5,3 und dem 2,5-fachen Volumen an Ethanol versetzt, gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Das Präzipitat wurde durch 10- bis 20-minütiges Zentrifugieren (14.000 Upm, RT, Heraeus® Biofuge Pico) pelletiert. Der Niederschlag wurde mit 70% Ethanol gewaschen, um Salze zu entfernen. Nach erneutem kurzem Zentrifugieren wurde das Pellet bei RT getrocknet und in einem kleinen Volumen $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ oder TE-Puffer gelöst.

Maxipräparation von Cosmid- bzw. Plasmid-DNA aus *E.coli*

Die Maxipräparation der Plasmide und Cosmide wurde mit dem JETSTAR®-Kit von Genomed durchgeführt. Dabei wurde das Protokoll des Herstellers verwendet.

4.3.2 *in vitro*-Modifikationen von DNA

In vitro Standard-Modifikationen wie die Restriktion von DNA, Dephosphorylierung linearer DNA-Fragmente und Ligation von DNA-Fragmenten wurden nach (Sambrook *et al.*, 1989) und nach Anleitung der Hersteller durchgeführt.

4.3.3 Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren

Nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

In einem Agarosegel können Nukleinsäuren im elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe aufgetrennt, identifiziert und isoliert werden (Sambrook *et al.*, 1989). In der Regel wurden Gele mit 1% Agarose hergestellt. Hierfür wurde die entsprechende Menge an Agarose in $1\times\text{TAE}$ - oder $0,5\times\text{TBE}$ -Puffer aufgekocht, nach Abkühlung auf ca. 60°C mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration $0,5\ \mu\text{g/ml}$) und in einen Elektrophoreseschlitten gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde die Gelkammer mit $1\times\text{TAE}$ - bzw. $0,5\times\text{TBE}$ -Puffer gefüllt. Die Proben wurden vor dem Auftragen im Verhältnis 10:1 mit nativem Auftragspuffer gemischt. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung ($5\text{-}10\ \text{V/cm}^2$). Die DNA-Banden konnten im UV-Durchlicht (304 nm) mit einem Geldokumentationssystem (Biotec-Fischer) detektiert und auf Thermopapier photographisch dokumentiert werden.

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der Qiagen Gel Extraction Kit (Qiagen) verwendet.

Denaturierende Glyoxal/DMSO-Gelelektrophorese von RNA

Eine Denaturierung der RNA durch eine Behandlung mit Glyoxal und DMSO erreicht werden. Diese Methode hat gegenüber der häufig verwendeten Formamid/Formaldehyd-Denaturierung den Vorteil, bei der Gelelektrophorese eine deutlich bessere Auftrennung der Fragmente zu bieten. Die RNA-Probe (5-15 µg) wurde dazu in 16 µl MOPS-Puffer mit 1 M Glyoxal und 50% DMSO für 1 h bei 50°C denaturiert, mit 4 µl RNA-Auftragspuffer versetzt und auf ein 1% MOPS-Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 5-7 V/cm² für 2 h, das Gel wurde alle 30 min im Puffer umgedreht und gleichzeitig die Elektrodenpolung vertauscht, um den pH-Wert des Puffers möglichst konstant zu halten. In der Regel wurden mehrere parallele Auftrennungen gleichzeitig durchgeführt.

Transfer von Nukleinsäuren

Transfer von DNA (Southern-Blot)

Diese Methode ist modifiziert nach Southern (Southern, 1975). Der Transfer der aufgetrennten DNA-Fragmente aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran erfolgte durch Kapillar-Blot. Hierbei wird die Transfer-Lösung (0,4 M NaOH) aus einem Pufferreservoir über Kapillarkräfte durch das Gel hindurch in einen auf dem Gel platzierten Stapel Papierhandtücher gesaugt. Die DNA-Fragmente werden durch den Pufferstrom aus dem Gel eluiert und binden an die darüberliegende Nylonmembran (Hybond-N⁺, Amersham Pharmacia Biotech). Vor dem Transfer wurde das Agarosegel für 15 min in 0,25 M HCl inkubiert, um einen Teil der Purine abzuspalten, damit ein Transfer großer DNA-Fragmente erleichtert wird. Anschliessend wurde das Gel für 15 min in 0,4 M NaCl inkubiert. Der Kapillar-Blot erfolgte in der Regel über Nacht, mindestens aber für 2 h. Anschließend wurde die Membran getrocknet und die DNA-Moleküle durch UV-Bestrahlung (254 nm, 1200 mJ/cm²) im Stratalinker 2400 (Stratagene) kovalent mit der Membran verknüpft.

Transfer von RNA (Northern-Blot)

Vor dem Transfer wurden die MOPS-RNA-Gele für 15 min in 20x SSC äquilibriert. Der Transfer der Nukleinsäuren auf eine Nylonmembran (Hybond-N⁺, Amersham Pharmacia Biotech) erfolgte durch Kapillar-Blot in 20x SSC über Nacht. Anschließend wurde die Membran getrocknet und die RNA-Moleküle durch UV-Bestrahlung (254 nm, 1200 mJ/cm²) im Stratalinker 2400 (Stratagene) kovalent mit der Membran verknüpft. Ein Nachweis der transferierten 18S- und 28S-rRNA-Banden auf der Membran wurde mittels Färbung mit Methylblau (200 mg/l in 300 mM Na-Acetat) durchgeführt. Dazu wurde die

Membran in der Färbelösung 5 min inkubiert, anschließend mit H₂O gewaschen, getrocknet und das Bandenmuster photographisch dokumentiert.

Spezifischer Nachweis von Membran - gebundener DNA (Gilbert *et al.*, 1996)

Die Hybond N⁺ Membranen (Amersham Pharmacia) wurden mit Southern-Hybridisierungspuffer für 20 min bei 60°C präinkubiert. Nach Wechsel der Hybridisierungslösung wurde die bei 95°C für 5 min denaturierte, radioaktive Hybridisierungsprobe zugegeben (Endkonzentration etwa 10⁶ cpm/ml). Die spezifische Hybridisierung erfolgte bei 60°C über Nacht. Die Filter wurden zweimal je 15 min bei 60°C mit Southern-Waschpuffer gewaschen. Schließlich wurden die Filter in Plastikfolie eingeschweißt und in Kassetten mit Verstärkerfolie (Suprema Universal 100, Dr. Goos) mit Röntgenfilmen bei -80°C exponiert. Nach 12 h wurde der Röntgenfilm entwickelt.

Spezifischer Nachweis immobilisierter RNA im Northern Blot

Die Hybond-N⁺-Membranen (Amersham Pharmacia Biotech) wurden mit Hybridisierungspuffer für 20 min bei 60°C präinkubiert. Nach Wechsel der Hybridisierungslösung wurde die bei 95°C für 5 min denaturierte radioaktive Hybridisierungsprobe zugegeben (Endkonzentration etwa 10⁶ cpm/ml). Die spezifische Hybridisierung erfolgte bei 60°C über Nacht. Die Filter wurden zweimal je 15 min bei 60°C mit Waschpuffer gewaschen. Schließlich wurden die Filter in Plastikfolie eingeschweißt und in Kassetten mit Verstärkerfolie mit Röntgenfilmen bei -80°C exponiert.

Herstellung von Hybridisierungssonden für Northern- und Southern Analysen

Doppelsträngige Hybridisierungssonden wurden mit dem Megaprime™ DNA Labelling systems (Amersham) Kit (NEB Biolabs) unter Verwendung von $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP hergestellt. Das als Sonde vorgesehene denaturierte DNA-Fragment wird in einem Gemisch aus Hexanukleotiden zufälliger Sequenz durch den Einbau von $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP vom Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I radioaktiv markiert. Dazu wurde nach Anleitung des Kits vorgegangen.

Der Ansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend die nicht eingebauten Nukleotide über Mobitec S-200 Säulen durch Zentrifugation abgetrennt. 1 μl des Eluats wurden zur Bestimmung der spezifischen Aktivität der Probe in einem LS 5000 TD Szintillationszähler (Beckman) nach Cherenkov gemessen. Die Gesamtaktivität der Proben lag zwischen 5×10^6 und 2×10^7 cpm. Es wurde folgende Sonde für diese Arbeit verwendet: **Red1 LTR+Start:** 483 bp PCR-Produkt (MB390/MB391) aus dem komplementierenden red1-Fragment. BamHI-Fragment aus pKJ61, **Red1 N-Terminus:** 239 bp PstI/EcoRV-Fragment aus pKJ35, **ppi1:** ein 430 bp EcoRI Fragment aus pCR-ppi1.

4.3.4 Sequenz- und Strukturanalyse

DNA wurde mit einem Sequenzierer Modell 400 von Li-Cor sequenziert. Die Sequenzreaktion wurde unter Verwendung des „Thermo sequence fluorescent labelled primer cycle sequencing kit“ (Amersham) durchgeführt. Das Prinzip entspricht der Didesoxy-Methode nach Sanger *et al.*, (1977). In den Reaktionsansatz werden ddNTPs zugegeben, durch deren Einbau ein Kettenabbruch erfolgt. Die verwendeten Sequenzierprimer M13 waren mit einem Fluoreszenz-Farbstoff (IRD800 für M13 fwd. Und IRD700 für M13 rev.) markiert. Die verschiedenen Basen wurden in getrennten Ansätzen hergestellt. Ein 0,9 µl Aliquot wurde anschließend auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel (SequaGel XR, National Diagnostics) aufgetragen. Die Banden wurden nach der Auftrennung in einem Sequenzgel und Anregung durch einen Laser von einer Photozelle detektiert. Die erhaltenen Daten wurden mit der Software des Sequenzierautomaten auf einem PC ausgewertet und die so erhaltenen Sequenz-Rohdaten konnten zur weiteren Bearbeitung in das Programm Sequencher (Gene-Codes) exportiert werden.

Es wurden folgende Programme benutzt:

DNA-STRIDER 1.3 (Douglas, 1995; Marck, 1988) zur Erstellung und zur Bearbeitung von Plasmid- und genomischen Sequenzen; wichtig vor allem zur Vorbereitung von Klonierungsschritten.

BLAST2 (Altschul *et al.*, 1990; Altschul *et al.*, 1997; Gish and States, 1993; Madden *et al.*, 1996) zur Identifikation ähnlicher Proteine oder DNA-Sequenzen in den öffentlichen Datenbanken.

CLUSTALW (Eddy, 1995) und **CLUSTALX** (Heringa, 1999) zum Vergleich und aneinander Anpassen (Alignment) mehrerer Protein- oder DNA-Sequenzen.

SEQUENCHER 4.1 (Miller und Powell, 1994) Zur Auswertung der Sequenzdaten, insbesondere der erhaltenen Chromatogramme.

SEQVU 1.0.1 (THE GARVAN INSTITUTE OF MEDICAL RESEARCH, SIDNEY) zur Bearbeitung von Sequenz-Alignments.

4.3.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR-Amplifikation können definierte DNA-Sequenzen aus einem komplexen Gemisch von DNA selektiv angereichert werden (Innis *et al.*, 1990). Man benötigt hierzu zwei Primer, von denen der eine zum 3'-Bereich der gewünschten Sequenz und der andere zum Gegenstrang des 5'-Bereiches komplementär ist. Die Reaktionen wurden in einem Trio-Thermoblock (Biometra) oder einem Personal Cycler (Biometra) durchgeführt.

Ein typischer PCR-Ansatz enthielt:

100 ng DNA
 1 µl Primer 1 (25 pmol/µl)
 1 µl Primer 2 (25 pmol/µl)
 1 µl dNTPs (je 10mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP)
 0,5 µl Taq DNA-Polymerase (1 U/µl)
 2 µl 50 mM MgCl₂
 5 µl 10× PCR-Puffer
 in 50 µl H₂O_{bid}.
 (überschichtet mit ca. 50 µl Paraffin).

Die Reaktion läßt sich in drei Abschnitte unterteilen:

1 Zyklus **Denaturierung** bei 95°C 3 Minuten. Er dient zur vollständigen Denaturierung der Template DNA. Erst nach diesem Schritt wurde die Taq DNA-Polymerase zu der Reaktion gegeben ("Hot Start").

30 Zyklen **Amplifikation**: 1 min. Denaturierung bei 93°C, 1 min. Binden der Primer bei 50-65°C, 1 min. Polymerisation durch Taq bei 72°C.

1 Zyklus **Verlängerung** bei 72°C 10 Minuten ist nötig, um nicht vollständig synthetisierte Fragmente zu vervollständigen.

Die wichtigsten Parameter einer PCR-Reaktion sind die Temperatur, bei der die Primer binden, und die Konzentration von Mg²⁺-Ionen.

Als Puffersystem wurde das der Taq DNA Polymerase von GibcoBRL verwendet, das sowohl den 10x PCR-Puffer als auch separaten 50 mM MgCl₂ enthielt.

Ganz-Zell-PCR aus *Ustilago maydis* Zellen

Zur einfachen Überprüfung von Transformanten und der Bestimmung des Kreuzungstyps der Nachkommen kann man eine PCR direkt aus *U. maydis* Zellen durchführen. Dabei sind jedoch einige Punkte zu beachten: (1) das Zellmaterial sollte frisch sein, idealerweise als drei Tage alte Kolonie von einer PD-Platte, (2) es sollte nicht zuviel Material eingesetzt werden, idealerweise eine Kolonie mit einem Durchmesser von etwa 1 mm, (3) die Amplifikation von Fragmenten, die länger als 1,5 kb sind, verläuft generell relativ schlecht und nicht immer reproduzierbar, (4) die Elongationszeiten müssen für eine

erfolgreiche Amplifikation gegenüber Standard-PCR-Ansätzen verdoppelt werden, und (5) kommt es immer wieder zum Ausfall einzelner Reaktionen.

Bestimmung des Kreuzungstyps

a1	MB216/MB217	erwartete Fragmentgrösse: 1100 bp
a2	MB218/MB219	erwartete Fragmentgrösse: 900 bp
b1	MB220/MB221	erwartete Fragmentgrösse: 750 bp
b2	MB222/MB223	erwartete Fragmentgrösse: 560 bp

Aufgrund der unterschiedlichen Fragmentgrössen konnten alle vier Reaktionen zusammen durchgeführt werden.

Der PCR-Ansatz enthielt:

abgestrichene Zellen

1,2 µl Primer MB216 (25 pmol/µl)
1,2 µl Primer MB217 (25 pmol/µl)
0,2 µl Primer MB218 (25 pmol/µl)
0,2 µl Primer MB219 (25 pmol/µl)
0,4 µl Primer MB220 (25 pmol/µl)
0,4 µl Primer MB221 (25 pmol/µl)
0,06 µl Primer MB222 (25 pmol/µl)
0,06 µl Primer MB223 (25 pmol/µl)
0,5 µl dNTPs (je 10mM dATP, dCTP,
dGTP und dTTP)
0,25 µl Taq DNA-Polymerase (1 U/µl)
1 µl 50 mM MgCl₂
2,5 µl 10× PCR-Puffer
in 25 µl H₂O_{bid}.
(überschichtet mit ca. 50 µl Paraffin).

Die Reaktion läßt sich in drei Abschnitte unterteilen:

1 Zyklus **Denaturierung**: 10 Minuten bei 93°C.

30 Zyklen **Amplifikation**: 45 sek. Denaturierung bei 93°C, 30 sek. Binden der Primer bei 50 °C, 100 sek. Polymerisation durch Taq bei 72°C.

1 Zyklus **Verlängerung** 10 Minuten bei 72°C.

bis zur Weiterverwendung Lagerung bei 4 °C

4.3.6 Identifizierung von cDNA mit Hilfe der Methode der „Rapid Amplification of cDNA Ends“ (RACE)

Die Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) wird zur Amplifizierung von cDNA Enden mit Hilfe einer PCR verwendet. Hierbei wird eine PCR mit einem unspezifischen und einem Gene-spezifischen Primer durchgeführt. Die RACE eignet sich zur Identifizierung von unbekannten cDNA-Enden, zur Amplifizierung seltener cDNAs und um unterschiedliche Formen von mRNA eines Gens zu isolieren. Mit der 5'RACE wird das 5'Ende einer mRNA amplifiziert. Hierbei werden Gen-spezifische Primer zur Herstellung von 1st Strang cDNA eingesetzt und in der nachfolgenden PCR wird mit einem Gen-spezifischen Primer, der innerhalb der 1st Strang cDNA liegt und einem unspezifischer polyT-Primer die DNA amplifiziert. Mit der 3'RACE wird das 3'Ende einer mRNA amplifiziert. Bei der 3'RACE, wird für die 1st Strang Synthese der cDNA ein unspezifischer Primer, der aus polyT und einer Adapter-Sequenz besteht, verwendet. Zur Amplifizierung wird ein unspezifischer Primer, der aus der Adapter-Sequenz besteht und ein Gen-spezifischer Primer eingesetzt. Die erhaltenen PCR Produkt kann in einen Vektor mit überhängenden A-Enden kloniert werden.

Zur Herstellung der cDNA wurde eine reverse Transkription mit dem Oligo MB151 durchgeführt. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers der Reversen Transkriptase SuperScript™ RNase H⁻ Gibco BRL® vorgegangen. Die Inaktivierung der Reversen Transkriptase erfolgte für 15 min bei 70°C.

Zur weiteren Amplifikation der cDNA wurde das Adapteroligonukleotid zu MB151, MB152 eingesetzt. Als spezifische Oligonukleotide für die Glukosyltransferase wurden die degenertierten Primer MB154 oder MB 155 verwendet. Diese wurden aus konservierten Teilen des C-Terminus der Sterolglukosyltransferasen Ugt51 aus Hefe abgeleitet. Es wurden die Kombinationen MB152 + MB154 und MB152 + MB155 in verschiedenen PCR-Reaktionen mit verschiedenen cDNAs eingesetzt. Die PCR erfolgte bei vier verschiedenen Hybridisierungstemperaturen.

Denaturierung: 4 min. 95°C

Amplifikation: 30 Zyklen

45 sek. 93°C Denaturierung; 45 sek. Annealing 50°C, 55°C, 60°C bzw. 65°C, 1 min. 72°C Elongation durch Taq-Polymerase

Elongationsphase: anschliessend 5 min. 72°C.

Ausgewählte DNA-Banden wurden isoliert, in pBS IISK (+) kloniert und mittels M 13 fwd und M 13 rev sequenziert.

4.4 Biochemische Methoden

4.4.1 Proteinreinigung

Gelsystem und Proteinstandard

Zur Auftrennung von Proteinen wurden SDS-haltige Polyacrylamid-Gele mit einem diskontinuierlichen Puffersystem (Laemmli, 1970) verwendet. Die Anfärbung der Proteine im Gel erfolgte mit einer Silberfärbung. Diese Standardmethode folgte den Protokollen von (Sambrook *et al.*, 1989). Als Proteinase-Inhibitor wurde in der Regel 1 mM Pefablock (Boehringer) oder 10 µg/ml Proteinase Inhibitor Cocktail (Sigma) verwendet. Die Protein-Konzentration einer Lösung wurde mit Hilfe des Bradford-Reagenz (Sigma) bestimmt.

Proteingrößenstandard:

"Protein Test Mixtures" (Serva)

97,4 kDa, 67 kDa, 45 kDa, 29 kDa, 21 kDa, 12,5 kDa, 6,5 kDa,

Isolierung von Gesamtprotein aus *Ustilago maydis*

Gesamt-Protein aus *U. maydis* wurde aus einer 1 l Flüssigkultur gewonnen. Hierzu wurde YNB-Medium pH 6,0 + 5% Glukose ohne Stickstoffquelle 1:100 aus einer YEPS-Vorkultur angeimpft. Die Zellen wurden pelletiert (4.000 Upm, 10 min, 4°C, Heraeus Megafuge 1.0R) und mit 100 ml 25 mM Tris-HCl pH 7,7 gewaschen. Die Suspension wurde abzentrifugiert (4.000 Upm, 10 min, 4°C, Heraeus Megafuge 1.0R) und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 18 ml Proteinaufnahmepuffer aufgenommen, so dass das Endvolumen 20 ml betrug. Die Zellen wurden in der French Pressure Cell SLM (Aminco) bei 100.000 kPa aufgeschlossen.

100.000g Zentrifugation

Nach dem Zellaufschluss wurde die Suspension abzentrifugiert (8000 Upm, 10 min, 4°C, Heraeus Biofuge Pico). Der Überstand wurde in der Ultrazentrifuge abzentrifugiert (45.000 Upm (100.000 g), 1h, 4°C, Rotor Ti80 Sorvall, L7 Ultrazentrifuge Beckmann). Das Pellet wurde in 2 ml Proteinpuffer aufgenommen und für weitere Reinigungsschritten eingesetzt

SDS-Gelelektrophorese von Proteinen

Zur Auftrennung von Proteinen wurde die Methode der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) angewendet (Laemmli, 1970). Proteinextrakte werden dabei unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch ihrer Molekülmasse entsprechend aufgetrennt. Dabei

wird zwischen zwei vertikale Glasplatten ein Trenngel und darüber ein weitmaschigeres Sammelgel gegossen. Im Sammelgel werden Proteine an der pH-Grenze verdichtet und anschließend im Trenngel nach ihrer Größe aufgetrennt. Durch dieses diskontinuierliche System wird eine höhere Bandenschärfe erzielt. Es wurden in der Regel 100 µg Proteinextrakt in einer Mini Protean II Apparatur (Biorad) bei 200 V für 1 h aufgetrennt. Für die Auftrennung von Proteinextrakten zur Visualisierung der einzelnen Reinigungsschritte wurden 10 oder 12%ige Trenngele verwendet. Zur Detektion der Proteinbanden und des Größenmarkers wurden die Gele nach der Auftrennung für 10 min in Protein-Coomassie-Färbelösung gefärbt und anschließend in Entfärbelösung entfärbt, bis die Banden gut sichtbar waren.

Eine weitere Methode zur Proteindetektion ist die Färbung der SDS-PAGE mit Silbersalzen (Wray *et al.*, 1981). Diese Methode ist etwa 100fach sensitiver als die Färbung mit Coomassie-Farbstoffen.

Nach Auftrennung der Proteine im SDS-PAGE wurden die Proteine in 4°C in Ethanol: Essigsäure konz.:H₂O (30:10:60) fixiert. Danach wurde das Gel für 30 min in 30% igen Ethanol und nachfolgend für 10 min in H₂O_{bidest} gewaschen. Gefärbt wurde mit einer Silberlösung (0,1% AgNO₃ in H₂O_{bidest}). Die Färbung wurde für 30 min bei RT inkubiert. Danach wurde das Gel zweimal mit H₂O_{bidest} abgespült. Zur Entwicklung mit einer Entwickler-Lösung (2,5% Na₂CO₃, 0,02% Formaldehyd) solange behandelt, bis der gewünschte Kontrast zu sehen ist; dies sollte innerhalb von 1-2 min geschehen. Um die Reaktion zu stoppen, wird das Gel 1-2 min mit 1% iger Essigsäure gewaschen und mit H₂O mehrfach abgespült.

4.4.2 Proteinreinigung

Ammoniumsulfatfällung

Die Ammoniumsulfat-Fällung beruht auf dem Aussalzeffekt von Proteinen. Dieser Aussalz-Effekt ist das Ergebnis der Konkurrenz zwischen Salz-Ionen und anderen gelösten Stoffen um die solvatisierenden Moleküle. Bei höheren Salzkonzentrationen werden so viele zugegebene Ionen solvatisiert, dass der zur Verfügung stehende Lösungsmittelvorrat nicht mehr ausreicht, andere Substanzen in Lösung zu halten.

Zuerst musste eine gesättigte Ammoniumsulfat (AS)-Lösung hergestellt werden. Hierzu wurde im Überschuss in H₂O_{bidest} gelöst und bei 4°C aufbewahrt. Vor Verwendung wurde ein Aliquot entnommen und anzentrifugiert (5000 Upm, 10 min, 4°C, Heraeus Biofuge Pico). Die gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung wurde langsam unter Rühren der Proteinelösung zugegeben. Hierbei wurde immer soviel zugegeben, dass z.B. 30, 40, 50 oder 60% AS-Sättigung erreicht wurde. Die Protein-AS-Lösung wurde für 30 min bei 4°C langsam gerührt und dann abzentrifugiert (14.000 Upm, 20min, 4°C (Heraeus Biofuge Pico). Es wurde sowohl die Enzymaktivität des Überstandes als auch des Pellets gemessen. Hierzu wurde das Pellet im gleichen Volumen wie das des Überstandes in Proteinpuffer gelöst.

DEAE-Anionen-Austauscher

Um eine fraktionierte Reinigung der Glukosyltransferase zu erreichen, wurde eine DEAE-Anionen-Austauscher-Säule (30 ml Diethylaminoethyl Cellulose, XP16-Column, Pharmacia) verwendet. Hierzu wurde eine FPLC (Fast performance liquid chromatography) verwendet, die es ermöglicht einen Gradienten computergestützt zu erzeugen. Als FPLC wurde das Waters 650-Advanced Protein Purification System, Water, Millipore verwendet. Als Puffer wurden Lösung A (50 mM Tris-HCl pH 7,7) und Lösung B (50 mM Tris-HCl pH 7,7, 2 M NaCl) verwendet. Die Laufgeschwindigkeit betrug 3 ml/min. Die Proben wurden als 6 ml-Fraktionen gesammelt.

Zuerst wurden 12 ml des gelösten 100.000g-Pellets auf die Säule aufgetragen. Dann wurde 30 min mit der Lösung A gewaschen (Durchlauf), um alle Proteine, die nicht an die Säule gebunden haben, zu entfernen. Über 33 min wurde ein Gradient von 0-400 mM NaCl aufgebaut. Hierbei werden die Proteine nach ihrer Bindungsfähigkeit an das Säulenmaterial in Konkurrenz zur NaCl Konzentration graduell wieder abgetrennt. Nachfolgend erfolgte ein Salzwassschritt für 10 min. mit Lösung B, wobei alle Proteine, auch stark gebundene, von dem Säulenmaterial entfernt werden und das Säulenmaterial so wieder gereinigt werden konnte. Die erhaltenen 6 ml Fraktionen wurden ebenso wie auch das Ausgangsmaterial direkt in den Enzymassay eingesetzt.

4.4.3 Glukosyltransferase-Assay

Bei der Glukosyltransferase-Aktivitätsmessung macht man sich sowohl die Substratspezifität vieler Glukosyltransferasen zu eigen (Kim *et al.*, 1997), als auch die Tatsache, dass sich die chemischen Eigenschaften der Substrate durch Glukosyltransferase-Aktivität verändern und diese verfolgt werden kann (Breithaupt and Light, 1982).

In der Abb.4, Ergebnisse ist eine Skizze des Reaktionsschemas der Ustilinsäure abhängige Glukosyltransferase.

Ustilinsäure- Präparation

Ustilinsäure wurde durch Methanolyse der Ustilaginsäure hergestellt. Diese Präparation wurde nach (Morrison, 1986) so modifiziert, dass sie in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß durchgeführt werden konnte.

2 mg Ustilaginsäure wurden in 870 µl Methanol, 90 µl HCl 37%, und 120 µl H₂O gelöst und 18 h bei 78°C in einem Eppendorf-Heizblock inkubiert. Die Reaktion wurde 3 mal mit 1 ml Petrolether extrahiert. Hierzu wurde 1 ml Petrolether zugegeben, 2 min kräftig gevortext und abzentrifugiert (14.000 Upm, 10 min, RT, Heraeus Biofuge Pico). Der Überstand wurde abgenommen und der Petrolether in der Speedvac (Speed Vac Concentrator, Savant) abgedampft. Das gelbe Öl (2-3 mg) wurde gewogen und bei -20°C gelagert. Um in den Enzymassay eingesetzt zu werden, wurde die Ustilinsäure bei einer Konzentration von 5 mg/ml in 0,1% Triton X100 aufgenommen und mittels Ultraschall suspendiert.

Nachweis der Ustilinsäure

Der Nachweis der präparierten Ustilinsäure erfolgte durch HPLC-Messung. Diese wurde im Labor von Prof. Dr. Marahiel (FB Chemie, Universität Marburg) durchgeführt. Als Messmethode wurde ein APCI-Massenspektrum (Atmospheric pressure chemical ionisation) mit negativer Polarität verwendet, um die Ustilinsäure als Anion nachzuweisen. Die Ustilinsäure, wie auch die kommerziell erwerblichen Referenzsubstanzen Junipersäure (16-Hexadekansäure) und 1,2-Hexadekandiol wurden in Methanol gelöst.

Glukosyltransferase-Assay

Der Enzymassay bestand aus 100 µl Proteinextrakt, 2 µl UDP-¹⁴C-Glukose (25 µCi/ml, Amersham) und 5 µl Ustilinsäure (Eigenpräparat ca. 5 mg/ml in 0,1% Triton X 100 gelöst und mit Ultraschall suspendiert) aufgefüllt auf 250 µl mit Proteinaufnahmepuffer (0,1M Tris-HCl pH7,7, 0,1 mM DTT, 0,2% Triton-X100, Proteinase Inhibitor 10 µg/ml). Zusätzlich wurden 10 µl des Lipid-Überstandes aus der 100.000g-Zentrifugation zugegeben. Dieser Lipid-Überstand hatte sich bei der 100.000 g-Zentrifugation oben abgesetzt. Die Reaktion wurde 30 min bei RT inkubiert und durch Zugabe von 200 µl 0,2 M HCl gestoppt. Die Extraktion erfolgte mit 800 µl Extraktionspuffer (Ether:Ethylacetat, 1:1). Dieser wurde zu

der gestoppten Reaktion zugegeben und 2 min kräftig geschüttelt. Nach Phasentrennung durch Zentrifugation (14.000 Upm, 10 min, RT, Heraeus Biofuge Pico) wurden 400 µl der oberen Phase vorsichtig abgenommen und in ein 10 ml Szintillationsgefäß (10 ml Probengefäß, Sarstedt) gefüllt. Zur Verstärkung der Messung wurde 10 ml Scintillator-Flüssigkeit (Quicksafe, Zinsser Analytic) zugegeben und durch vortexen vermischt. Im Tri-Carb Liquid Scintillation Analyser 1900 CA (Packard) wurde mit dem Programm 14 die ^{14}C -Radioaktivität gemessen. Während nicht aktive Proben unter 50 dpm lagen, wurden die Proben als positiv gewertet, die über 100 dpm lagen.

4.4.4 Reinigung und Nachweis der Ustilaginsäure

Stamm- und Medienauswahl

Durch die nadelförmigen Kristalle, die die Ustilaginsäure in wässrigem Medium bildet, konnte dies mikroskopisch nachvollzogen werden.

Ustilaginsäure wird unter Stickstoff-limitierten Bedingungen gebildet (Haskins et al., 1950). In dem kommerziell erwerblichen Medium YNB-Medium wurde mit 5% Glukose als C-Quelle in Abwesenheit einer Stickstoffquelle bei einem pH von 6,0 sehr viel und sehr schnell Ustilaginsäure produziert. Die Ustilaginsäure-Produktion konnte durch Zugabe von 0,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ vollständig verhindert werden. Falls nicht anders angegeben, wurde aus einer YEPS-Flüssigkultur 1:100 angeimpft.

Ustilaginsäure-Isolierung in *U. maydis*

Die Ustilaginsäure-Reinigung bzw. Isolierung folgte nach den Angaben von Haskins (1955).

1l-YNB pH6,0 + 5% Glukose wurde 1:100 aus einer YEPS-Flüssigkultur angeimpft und für 3d, bei 28°C geschüttelt. Die Zellen und die Ustilaginsäure wurden für 20 min bei RT und 4000Upm (A6,14 Rotor, Centrikon H-401, Kontron Hermle) abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Um die UA zu lösen wurde zu dem Zell-UA-Gemisch 200 ml Methanol zugegeben und auf 30°C erwärmt. Das Methanol-Gemisch wurde abzentrifugiert (20 min, RT, 4000Upm, A6,14 Rotor, Centrikon H-401, Kontron Hermle) und das Pellet, indem sich die Zellen befanden verworfen. In dem Überstand befindet sich die in Methanol gelöste Ustilaginsäure. Um diese auszukristallisieren, wurde 1800 ml 50°C heißes $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ zugegeben und üN langsam im Wasserbad abgekühlt. Die auskristallisierte Ustilaginsäure konnte nun abzentrifugiert werden (20 min, RT, 4000Upm, A6,14 Rotor, Centrikon H-401, Kontron Hermle) und mit 100 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ und danach mit 20 ml Ether gewaschen und bei RT getrocknet. Die Ausbeute betrug bis zu 4 g/l.

Nachweis der gereinigten Ustilaginsäure durch Dünnschichtchromatographie (TLC)

Der Nachweis der gereinigten Ustilaginsäure erfolgte über TLC. Dazu wurde ca. 10 µg UA in Methanol gelöst, auf eine TLC-Aluminium-Platte mit Kieselgel als Trägermaterial (Merck) aufgetropft und 5 min bei RT getrocknet. In dem Laufmittel Chloroform:Methanol: H_2O (65:25:4) konnte die Ustilaginsäure soweit aufgetrennt werden, dass die vier einzelnen Modifikationen sichtbar wurden. Die TLC erfolgte für

1h bei RT, bis die Lauffront ca. 2/3 der Platte erreicht hatte. Die Platte wurde für ca. 10 min an der Luft bei RT getrocknet. Die Detektion der Ustilaginsäure erfolgte durch Einsprühen der über TLC-Platte mit einem Gemisch aus 4-Methoxybenzaldehyd:Eisessig:H₂SO₄ (0,5:50:1), bis die Platte nass erscheint. Nach 15 min trocknen an der Luft wurde die TLC-Platte für 3 min bei 150°C erhitzt. Die Zuckerreste der Glykolipide werden hierbei als schwarze Flecken sichtbar (Frautz *et al.*, 1986).

Nachweis der Ustilaginsäure durch MALDITOF-MS

Für den Nachweis von Zuckern hat sich die MALDITOF-Massenspektrometrie als gut geeignete Methode herausgestellt, da sie sich für die Analyse nicht flüchtiger und thermisch labiler Substanzen eignet.

Zur Messung im MALDITOF-MS wurde die gereinigte UA in Methanol gelöst (ca. 0,1 µg/ml). Die Probe wurde 1:1 mit 0,1% TFA vermischt und 3 µl auf den Schlitten aufgetropft. Die Messung erfolgte im negativen Modus, sodass die UA als Anionen nachgewiesen wurden. Als Gegen Ion wurde Na⁺ mit gemessen. Die Messung erfolgte am MPI für terrestrische Mikrobiologie durch Dr. Thorsten Selmer, der auch die Anleitung zur Auswertung gab. .

Nachweis der Ustilaginsäure direkt aus dem Medium

Um den Ustilaginsäurenachweis direkt aus dem Medium ohne nachfolgende Fällung zu führen, erfolgte eine Ethylacetat-Extraktion. UA und andere hydrophobe Substanzen werden direkt aus dem Medium extrahiert.

Zu 0,5 ml der Flüssigkultur wird 0,5 ml Ethylacetat gegeben. Die Proben wurden für 10 min auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA) geschüttelt und anschliessend abzentrifugiert (14.000 Upm, 10 min, RT, Heraeus Biofuge Pico). Das Ethylacetat wurde in einem Eppendorf-Wärmeblock bei 70°C abgedampft und die UA in 15 µl Methanol aufgenommen und auf die TLC aufgetragen. Der weitere Nachweis der UA erfolgte wie unter „Nachweis der gereinigten Ustilaginsäure durch Dünnschichtchromatographie (TLC)“.

5. Literaturverzeichnis

- Aebi, M., and Hennet, T. (2001) Congenital disorders of glycosylation: genetic model systems lead the way. *Trends Cell Biol* **11**: 136-141.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403-410.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402.
- Ausubel, F.M., Brenz, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Strukl, K. (1987) *Current Protokols in Molecular Biology*. USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Banuett, F., and Herskowitz, I. (1989) Different *a* alleles are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 5878-5882.
- Banuett, F. (1991) Identification of genes governing filamentous growth and tumor induction by the plant pathogen *Ustilago maydis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 3922-3926.
- Banuett, F. (1992) *Ustilago maydis*, the delightful blight. *Trends Genet.* **8**: 174-180.
- Banuett, F. (1995) Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. *Annu. Rev. Genet.* **29**: 179-208.
- Banuett, F., and Herskowitz, I. (1996) Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development* **122**: 2965-2976.
- Barkay, T., Navon-Venezia, S., Ron, E.Z., and Rosenberg, E. (1999) Enhancement of solubilization and biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by the bioemulsifier alasan. *Appl Environ Microbiol* **65**: 2697-2702.
- Bauchwitz, R., and Holloman, W.K. (1990) Isolation of the REC2 gene controlling recombination in *Ustilago maydis*. *Gene* **96**: 285-288.
- Bölker, M., Genin, S., Lehmler, C., and Kahmann, R. (1995) Genetic regulation of mating, and dimorphism in *Ustilago maydis*. *Can. J. Bot.* **73**: 320-325.
- Bourne, Y., and Henrissat, B. (2001) Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional modules. *Curr Opin Struct Biol* **11**: 593-600.
- Brachmann, A. (2001) Die frühe Infektionsphase von *Ustilago maydis*: Genregulation durch das bW/bE-Heterodimer. In *Fakultät für Biologie München: Ludwig-Maximilians-Universität*.
- Brakemeier, A., Wullbrandt, D., and Lang, S. (1998) *Candida bombicola*: production of novel alkyl glycosides based on glucose/2-dodecanol. *Appl Microbiol Biotechnol* **50**: 161-166.
- Branny, P., Pearson, J.P., Pesci, E.C., Kohler, T., Iglewski, B.H., and Van Delden, C. (2001) Inhibition of quorum sensing by a *Pseudomonas aeruginosa* dksA homologue. *J Bacteriol* **183**: 1531-1539.
- Breithaupt, T.B., and Light, R.J. (1982) Affinity Chromatography an Further Characterization of the Glucosyltransferases Involved in Hydroxydocosanoic Acid sophoroside Production in *Candida borogiensis*. *J Biol Chem* **257**: 9622-9628.
- Brint, J.M., and Ohman, D.E. (1995) Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhlR-RhlI, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. *J Bacteriol* **177**: 7155-7163.
- Campbell, J.A., Davies, G.J., Bulone, V., and Henrissat, B. (1997) A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* **326**: 929-939.
- Campos-Garcia, J., Caro, A.D., Najera, R., Miller-Maier, R.M., Al-Tahhan, R.A., and Soberon-Chavez, G. (1998) The *Pseudomonas aeruginosa* rhlG gene encodes an

- NADPH-dependent beta-ketoacyl reductase which is specifically involved in rhamnolipid synthesis. *J Bacteriol* **180**: 4442-4451.
- Carillo, P.G., Mardaraz, C., Pitta-Alvarez, S.I., and Giulietti, A.M. (1996) Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. *World J Microbiol Biotech* **12**: 82-84.
- Chankvetadze, B., Endresz, G., Blaschke, G., Juza, M., Jakubetz, H., and Schurig, V. (1996) Analysis of charged cyclomalto-oligosaccharides (cyclodextrin) derivatives by ion-spray, matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight and fast-atom bombardment mass spectrometry, and by capillary electrophoresis. *Carbohydr Res* **287**: 139-155.
- Charnock, S.J., Henrissat, B., and Davies, G.J. (2001) Three-dimensional structures of UDP-sugar glycosyltransferases illuminate the biosynthesis of plant polysaccharides. *Plant Physiol* **125**: 527-531.
- Christensen, J.J. (1963) Corn smut induced by *Ustilago maydis*. *Amer. Phytopathol. Soc. Monogr.* **2**.
- Clarke, L., and Carbon, J. (1976) A colony bank containing synthetic Col El hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell* **9**: 91-99.
- Cohen, S.N., Chang, A.C., and Hsu, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**: 2110-2114.
- Cooper, D.G., and Zajic, J.E. (1980) Surface active compounds from microorganisms. *Adv Appl Microbiol* **26**: 229-253.
- Demerec, M., Adelberg, E.A., Clark, A.J., and Hartman, P.E. (1966) A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics. *Genetics* **54**: 61-76.
- Desai, J.D., and Banat, I.M. (1997) Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 47-64.
- Doerks, T., Strauss, M., Brendel, M., and Bork, P. (2000) GRAM, a novel domain in glucosyltransferases, myotubularins and other putative membrane-associated proteins. *Trends Biochem Sci* **25**: 483-485.
- Douglas, S.E. (1995) DNA Strider. An inexpensive sequence analysis package for the Macintosh. *Mol Biotechnol* **3**: 37-45.
- Eddy, S.R. (1995) Multiple alignment using hidden Markov models. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* **3**: 114-120.
- Esders, T., and Light, R. (1972) Glucosyl- and acetyltransferases involved in the biosynthesis of glycolipids from *Candida bogoriensis*. *J Biol Chem* **247**: 1375-1386.
- Fan, H. (1990) Influences of the long terminal repeats on retrovirus pathogenicity. *Semin. Virol.* **1**: 165-174.
- Flavell, A.J., Pearce, S.R., Heslop-Harrison, P., and Kumar, A. (1997) The evolution of Ty1-copia group retrotransposons in eukaryote genomes. *Genetica* **100**: 185-195.
- Frautz, B., Lang, S., and Wagner, F. (1984) Biosurfactant production by *Ustilago maydis*. In *3rd European Congress on Biotechnology*. Chemie, V. (ed.) München: Institute of Biochemistry and Biotechnology, Technical University of Braunschweig, pp. 79-83.
- Frautz, B., Lang, S., and Wagner, F. (1986) Formation of cellobiose lipids by growing and resting cells of *ustilago maydis*. *Biotechnology Letters* **8**: 757-762.
- Geiselbrecht, A.D., Herwig, R.P., Deming, J.W., and Staley, J.T. (1996) Enumeration and phylogenetic analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading marine bacteria from Puget sound sediments. *Appl Environ Microbiol* **62**: 3344-3349.
- Gilbert, M.S., Johnson, A., and Dean, R. (1996) Chemical signals responsible for appressorium formation in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Physiol Mol Plant Pathol* **48**: 335-346.
- Gillissen, B., Bergemann, J., Sandmann, C., Schröer, B., Bölker, M., and Kahmann, R. (1992) A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell* **68**: 647-657.
- Gish, W., and States, D.J. (1993) Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nat Genet* **3**: 266-272.
- Hamann, A., Feller, F., and Osiewacz, H.D. (2000) Yeti--a degenerate gypsy-like LTR retrotransposon in the filamentous ascomycete *Podospira anserina*. *Curr Genet* **38**: 132-140.
- Hanahan, D. (1985) Techniques for transformation in *E. coli*. In *DNA cloning, a practical approach*. Vol. 1. Rickwood, D. and Hames, B.D. (eds): IRL Press, pp. 109-135.

- Haskins, H.R. (1955) Ustilagic acid and the method of preparing the same. In *United states patent office*. Vol. 2,698,843 Canada.
- Haskins, R.H., and Thorn, J.A. (1951) Antibiotic Activity of Ustilagic Acid. *Canadian Journal of Botany* **29**: 585-592.
- Hoffman, C.S., and Winston, F. (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *E. coli*. *Gene* **57**: 267-272.
- Holliday, R. (1961a) The genetics of *Ustilago maydis*. *Genet. Res. Camb.* **2**: 204-230.
- Holliday, R. (1961b) Induced mitotic crossing-over in *Ustilago maydis*. *Genet. Res. Camb.* **2**: 231-248.
- Holliday, R. (1974) *Ustilago maydis*. In *Handbook of Genetics*. Vol. 1. King, R.C. (ed). New York, USA: Plenum Press, pp. 575-595.
- Huber, S. (2001) Isolierung und Charakterisierung des sporenspezifisch exprimierten Gens *ssp1* in *Ustilago maydis*.
- Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., and White, T.J., (eds) (1990) *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. San Diego, USA: Academic Press.
- Kahmann, R., G., S., Basse, C., Feldbrügge, M., and Kämper, J. (2000) *Ustilago maydis*, the causative agent of corn smut disease. In *Fungal Pathology*. Kronstad, J.W. (ed). Dodrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Kapitonov, D., and Yu, R.K. (1999) Conserved domains of glycosyltransferases. *Glycobiology* **9**: 961-978.
- Keon, J.P., Owen, J.W., and Hargreaves, J.A. (1999) Lack of evidence for antisense suppression in the fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **9**: 101-104.
- Kim, J.M., Vanguri, S., Boeke, J.D., Gabriel, A., and Voytas, D.F. (1998) Transposable elements and genome organization: a comprehensive survey of retrotransposons revealed by the complete *Saccharomyces cerevisiae* genome sequence. *Genome Res* **8**: 464-478.
- Kim, Y.H., Bae, K.H., Kim, T.J., Park, K.H., Lee, H.S., and Byun, S.M. (1997) Effect on product specificity of cyclodextrin glycosyltransferase by site-directed mutagenesis. *Biochem Mol Biol Int* **41**: 227-234.
- Konz, D., Doekel, S., and Marahiel, M.A. (1999) Molecular and biochemical characterization of the protein template controlling biosynthesis of the lipopeptide lichenysin. *J Bacteriol* **181**: 133-140.
- Konz, D., and Marahiel, M.A. (1999) How do peptide synthetases generate structural diversity? *Chem Biol* **6**: R39-48.
- Ladendorf, O. (2003) Transposition und heterologe genexpression in *Ustilago maydis*. In *Institut für terrestrische Mikrobiologie Marburg*: Philipps-Universität, pp. 197.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Latifi, A., Winson, M.K., Foglino, M., Bycroft, B.W., Stewart, G.S., Lazdunski, A., and Williams, P. (1995) Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mol Microbiol* **17**: 333-343.
- Latifi, A., Foglino, M., Tanaka, K., Williams, P., and Lazdunski, A. (1996) A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Mol Microbiol* **21**: 1137-1146.
- Lin, S.-C. (1996) Biosurfactants: Recent Advances. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **66**: 109-120.
- Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., and Darnell, J. (1996) *Molekulare Zellbiologie*. New York.
- Madden, T.L., Tatusov, R.L., and Zhang, J. (1996) Applications of network BLAST server. *Methods Enzymol* **266**: 131-141.
- Makkar, R.S., and Cameotra, S.S. (2002) An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **58**: 428-434.
- Marahiel, M.A., Nakano, M.M., and Zuber, P. (1993) Regulation of peptide antibiotic production in *Bacillus*. *Mol Microbiol* **7**: 631-636.

- Marck, C. (1988) 'DNA Strider': a 'C' program for the fast analysis of DNA and protein sequences on the Apple Macintosh family of computers. *Nucleic Acids Res* **16**: 1829-1836.
- Matzke, M., and Matzke, A.J. (2003) RNAi extends its reach. *Science* **301**: 1060-1061.
- Modrow, S., and Falke, D. (1997) *Molekulare Virologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Morrison, I.M. (1986) Glycolipids. In *Carbohydrate Analysis a practical approach*. Vol. 1. Kanmidy, C. (ed), pp. 205-221.
- Mount, S.M., and Rubin, G.M. (1985) Complete nucleotide sequence of the *Drosophila* transposable element *copia*: homology between copia and retroviral proteins. *Mol Cell Biol* **5**: 1630-1638.
- Murawksi, D.A. (2000) Pilze. *National Geographic (deutsche Ausgabe)* **August 2000**: 90-103.
- Neu, T.R., Dengler, T., Jann, B., and Poralla, K. (1992) Structural studies of an emulsion-stabilizing exopolysaccharide produced by an adhesive, hydrophobic *Rhodococcus* strain. *J Gen Microbiol* **138 (Pt 12)**: 2531-2537.
- Ochsner, U.A., Koch, A.K., Fiechter, A., and Reiser, J. (1994) Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **176**: 2044-2054.
- Ochsner, U.A., and Reiser, J. (1995) Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 6424-6428.
- Pearson, J.P., Pesci, E.C., and Iglewski, B.H. (1997) Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J Bacteriol* **179**: 5756-5767.
- Pearson, J.P. (2002) Early activation of quorum sensing. *J Bacteriol* **184**: 2569-2571.
- Pesci, E.C., Pearson, J.P., Seed, P.C., and Iglewski, B.H. (1997) Regulation of las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **179**: 3127-3132.
- Peypoux, F., Bonmatin, J.M., and Wallach, J. (1999) Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl Microbiol Biotechnol* **51**: 553-563.
- Reed, R.W., and Holder, M.A. (1953) The Antibacterial Spectrum of Ustilagic Acid. *Canadian Journal of Medical Science* **31**: 505-511.
- Ren, Q., Sierro, N., Witholt, B., and Kessler, B. (2000) FabG, an NADPH-dependent 3-ketoacyl reductase of *Pseudomonas aeruginosa*, provides precursors for medium-chain-length poly-3-hydroxyalkanoate biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **182**: 2978-2981.
- Richter, M., Willey, M., Suessmuth, R., Jung, G., and Fiedler, H.P. (1998) Streptofactin, a novel biosurfactant with aerial mycelium inducing activity from *Streptomyces tendae* Tue 901/8c. *FEMS Microbiol Lett* **163**: 165-171.
- Ron, E.Z., and Rosenberg, E. (2001) Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology* **4**: 229-236.
- Rosenberg, E., and Ron, E.Z. (1999) High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol* **52**: 154-162.
- Rushforth, A.M., and Anderson, P. (1996) Splicing removes the *Caenorhabditis elegans* transposon Tc1 from most mutant pre-mRNAs. *Mol Cell Biol* **16**: 422-429.
- Sambrook, J., Frisch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour, New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sandmeyer, S.B., Hansen, L.J., and Chalker, D.L. (1990) Integration specificity of retrotransposons and retroviruses. *Annu Rev Genet* **24**: 491-518.
- Sar, N., and E., R. (1983) Emulsifier production by *Acinetobacter calcoaceticus* strains. *Curr Microbiol* **9**: 309-314.
- Schauwecker, F., Wanner, G., and Kahmann, R. (1995) Filament-specific expression of a cellulase gene in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **376**: 617-625.
- Scheef, G., Fischer, N., Krach, U., and Tonjes, R.R. (2001) The number of a U3 repeat box acting as an enhancer in long terminal repeats of polytropic replication-competent porcine endogenous retroviruses dynamically fluctuates during serial virus passages in human cells. *J Virol* **75**: 6933-6940.

- Schmitt, M.E., Brown, T.A., and Trumpower, B.L. (1990) A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **18**: 3091-3092.
- Schramke, V., and Allshire, R. (2003) Hairpin RNAs and retrotransposon LTRs effect RNAi and chromatin-based gene silencing. *Science* **301**: 1069-1074.
- Schulz, B., Banuett, F., Dahl, M., Schlesinger, R., Schäfer, W., Martin, T., Herskowitz, I., and Kahmann, R. (1990) The *b* alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell* **60**: 295-306.
- Siegmund, I., and Wagner, F. (1991) New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. *Biotechnol Techniques* **5**: 265-268.
- Snetselaar, K.M., and Mims, C.W. (1992) Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia* **84**: 193-203.
- Snetselaar, K.M. (1993) Microscopic observation of *Ustilago maydis* mating interactions. *Experimental Mycology* **17**: 345-355.
- Snetselaar, K.M., and Mims, C.W. (1994) Light and electron microscopy of *Ustilago maydis* hyphae in maize. *Mycol. Res.* **98**: 347-355.
- Snetselaar, K.M., Bölker, M., and Kahmann, R. (1996) *Ustilago maydis* mating hyphae orient their growth toward pheromone sources. *Fungal Genetics and Biology* **20**: 299-312.
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-517.
- Spellig, T., Bölker, M., Lottspeich, F., Frank, R.W., and Kahmann, R. (1994) Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J.* **13**: 1620-1627.
- Spoeckner, S., Wray, V., Nimtz, M., and Lang, S. (1999) Glycolipids of the Smut fungus *Ustilago maydis* from the cultivation on renewable resources. *Appl Microbiol Biotechnol* **51**: 33-39.
- Streit, W.R., and Entcheva, P. (2003) Biotin in microbes, the genes involved in its biosynthesis, its biochemical role and perspectives for biotechnological production. *Appl Microbiol Biotechnol* **61**: 21-31.
- Suzuki, T.T., K. Matsubara, J. and Kimoshita, S. (1969) Trehalose lipid and branched-b-hydroxy fatty acids formed by bacteria grown on n-alkanes. *Agric Biol Chem* **33**: 1619-1625.
- Tani, S., Katsuyama, Y., Hayashi, T., Suzuki, H., Kato, M., Gomi, K., Kobayashi, T., and Tsukagoshi, N. (2001) Characterization of the amyR gene encoding a transcriptional activator for the amylase genes in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* **39**: 10-15.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680.
- Tsuge, K., Ano, T., and Shoda, M. (1996) Isolation of a gene essential for biosynthesis of the lipopeptide antibiotics plipastatinB1 and surfactin in *Bacillus subtilis* YB8. *Arch Microbiol* **165**: 243-251.
- Tsukuda, T., Carleton, S., Fotheringham, S., and Holloman, W.K. (1988) Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 3703-3709.
- Volpe, T., Schramke, V., Hamilton, G.L., White, S.A., Teng, G., Martienssen, R.A., and Allshire, R.C. (2003) RNA interference is required for normal centromere function in fission yeast. *Chromosome Res* **11**: 137-146.
- Voytas, D.F., and Boeke, J.D. (1993) Yeast retrotransposons and tRNAs. *Trends Genet* **9**: 421-427.
- Wang, J., Holden, D.W., and Leong, S.A. (1988) Gene transfer system for the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 865-869.
- Wang, R.L., Stec, A., Hey, J., Lukens, L., and Doebley, J. (1999) The limits of selection during maize domestication. *Nature* **398**: 236-239.
- Warnecke, D., Erdmann, R., Fahl, A., Hube, B., Müller, F., Zank, T., Zähringer, U., and Heinz, E. (1999) Cloning an functional expression of UGT genes encoding sterol glucosyltransferases from *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Pichia pastoris*, and *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem* **274**: 13048-13059.

- Weinzierl, G., Bohlmann, R., Brachmann, A., Hindemitt, T., Kahmann, R., and Kämper, J. (2001) A gene directly regulated by the *b* mating type locus of *Ustilago maydis* is involved in pathogenic development. In *21st Fungal Genetics Conference (Asilomar Conference Center)* Pacific Grove, CA.
- Wray, W., Boulukas, T., Wray, V.P., and Hancock, R. (1981) Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **118**: 197-203.
- Yakimov, M.M., Kroger, A., Slepak, T.N., Giuliano, L., Timmis, K.N., and Golyshin, P.N. (1998) A putative lichenysin A synthetase operon in *Bacillus licheniformis*: initial characterization. *Biochim Biophys Acta* **1399**: 141-153.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.
- Zhang, Y., and Miller, R.M. (1994) Effect of a *Pseudomonas rhamnolipid* biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. *Appl Environ Microbiol* **60**: 2101-2106.

6. Anhang

6.1 Aminosäure- und Nukleotidsequenz der UDP-Glukose-Glukosyltransferase ugt1 aus *U. maydis*

```

1 ctgcagggataacacaagccaacttagctgagtcgagctctccttgccaccgcacaccgacatgtcacatcgaatacatttgcttcctcgtaagcacc 100
101 cacaccccccagctegtaccaatcgagccccactagtgggctcttagcgcccca ATG GCG ACA ATC TCA TCA CAG TCG CGG CTC GAC 189
1 M A T I S S Q S R L D 11
190 TCC CCT TTC GAG TCG GCC AAG GAG CCA TCG ACC GAT TCA GCA TCA GCC TCA CAA CCG GCT GCC GCC GGC TTG GGT 264
12 S P F E S A K E P S T D S A S A S Q P A A A G L G 36
265 CGT CTC AAC GTC GAC GAC AAA CAT GAT GAT GCA TGT ATG CTC TCA CAG GCA TCA GAC AAC TTG GAC ACG CCG CCT 339
37 R L N V D D K H D D A C M L S Q A S D N L D T P P 61
340 TTC CCA ACA TCG CCT CGA CTC GAT CCT TGG TCG CCG CGC GAC TAC TCG ACC ATA TCT TCT CTG GCT GGT TCG CGA 414
62 F P T S P R L D P W S P R D Y S T I S S L A G S R 86
415 GAG CTA GGC AGA CCC GCA ATG GAA CCG ACC ACC AAG ACT TTC ACA GCA AGC TCG CTC CTC CCA GAA AGC CAA AGC 489
87 E L G R P A M E P T T K T F T A S S L L P E S Q S 111
490 AAA GCA TCC ATG AGC GTC ACA CCA CAT GCA GCA GCG GCT ACC CAA TCA GGC CTG GAT CTA GTG CAA GCA GAC GTC 564
112 K A S M S V T P H A A A A T Q S G L D L V Q A D V 136
565 GCT GAC GTT GCT TTT CAC GCT GAG CCG CAA GGT TTA ATG CAG ATG CTC AGT CTC GTC GGG AGC ACT TTC TTT GAT 639
137 A D V A F H A E P Q G L M Q M L S L V G S T F F D 161
640 GCT GAT ACC GAG GGA TAC ACA GAA GAC GAT GTC GAG GAT TCC GAC CTG CCG ACA CAC CCG CTG CCA ACA TCA CCA 714
162 A D T E G Y T E D V E D S D L P T H P L P T S P 186
715 CTC ATC ACC AAC ACG CAT TAC AAA CCA GAG GTG CAT TGC TCC GAG TCA GAG CAA GAC AGG CAA ACT CCT GAA CGC 789
187 L I T N T H Y K P E V H C S E S E Q D R Q T P E R 211
790 TCA ACC AAG GGC CGT CTG CCG GCT CTA GCG CGA GAC GAC CTG TCC GAA GAT GGC TCT ACA CCA CAG GGC AGC AGA 864
212 S T K G R L R A L A R D D L S E D G S T P Q G S R 236
865 TCG CCC TTG GAT GCA TCG GTG CTT ACC ATT GGT CCT AGT CGA GCA AAG CGC ACA TCA CTC ACT CAA AGC GAC ATT 939
237 S P L D A S V L T I G P F A K R T S L Q S D I 261
940 ATC GCA CCC TCG TGG GAT TCG ACA ATC ACG CGA GCA ACA AGG AGA CCC ACC CAT CTC CGT TCA CAG CTT CAT CAT 1014
262 I A P S W D S T I T R A T R R P T H L R S Q L H H 286
1015 GTC GCA TCC GCG TCC ATG TCT GCC TCG ACA TCT AAG CTA GCC AGC AGA GAT ATT GAT CAA GAT GGA CAA GGC ACT 1089
287 V A S A S M S A S T S K L A S R D I D Q D G Q G T 311
1090 CTG ACA ACG AGC AGC CCC TTC GAC GAA GAG TCG ACC GAC ACG CCA CAT GTA CCC CCG ACA CAA CAG CAG AGC ATG 1164
312 L T T S S P F D E E S T D T P H V P P T Q Q Q S M 336
1165 GAA AGC GAA AGC ATG CCG TCT GAT GCC GAT CGA CCA ACC AAA TGG AGC TCG GAT CCG CTC TTG ATA CGA CCA TAC 1239
337 E S E S M P S D A D R P T K W S S D P L L I R P Y 361
1240 CAA GAT GCA CAA GCT TCC GAT CAG AGG CAC TCG GAC GTG TGC GAA TCA GAT CGT CTC CGC CTG CTT CAC CAG CTC 1314
362 Q D A Q S D Q R H S D V C E E S D R L R L L H Q L 386
1315 AAG GAC ATC TTT CAT CTC GAC GCA GCA GAG ACG CTG CTG CTG GCA CAA CCA TGC TGG CTT TTT CGA TCG CTT CTT 1389
387 K D I F H L D A A E T L L L A Q P C W L F R S L L 411
1390 CTT CAG GGT CAT CTC TAC CTC ACA AGC AGT CAT GTG TGC TTC TAC GCC TAT CTG CCG TCT CGC GAC GAA AAG ACG 1464
412 L Q G H L Y L T S S H V C F Y A Y L P S R D E K T 436
1465 ATC AAG ACT GGT CTG CTC GGC AAG CGC ACG CGC AGG ACA CAT CGT TTC AGC AAG CAC TGG GCG TCA CTC AAA GGT 1539
437 I K T G L L G K R T R R T H R F S K H W A S L K G 461
1540 GGC AAG CTC AGC TGG TTC GAT AGC GAT CAA GAT CCC TAC TTT CCC CAG GGC CAC ATC GAC CTA CGC AAA GTG TCT 1614
462 G K L S W F D S D Q D P Y F P Q G H I D L R K V S 486
1615 GCC ATC GAG CCG TCC ACG ACT AAC AAG GAC CGC TTC AAG GTG ACC ACT CCA GCT CGC AGG TTC ACC TTC CTG ACC 1689
487 A I E P S T T N K D R F K V T T P A R R F T F L T 511
1690 GAA GGC GAG CAC AGC AGG GAT GCT TGG GTC TCA GCG CTG CAA AAG GAG ACG TTC CGC GCA CAG AAT CAG GGC GAG 1764
512 E G E H S R D A W V S A L Q K E T F R A Q N Q G E 536
1765 AGC GTC CGT ATC AGC ATT CCG CTC GAG ACG ATT ATC AAT GTT GAG ACC ACG CTG TCA GTC GAT GGT ACA GAT ATG 1839
537 S V R I S I P L E T I I N V E T T L S V D G T D M 561
1840 GCC TGC ATC ACT GTT GTT GAC GAG GCC GGC GAT TTC TCG ATC GAC GAA TAC TAC TTT TTG CAT CTC ACC AAG CCG 1914
562 A C I T V V D E A G D F S I D E Y Y F L H L T K P 586
1915 AGT GCT TTC ATC TCT GGT CTT AAC GCG CTT CTC AAT CAA GCT GTC CCG GGC TCA ATC TCA TCA CTT CAA GGC GGT 1989
587 S A F I S G L N A L L N Q A V R G S I S S L Q G G 611
1990 GAT CAG GCT CTC AGT CTC TCG AGG TTG AGC ATT CAT GAC TCC ACT AGC GCT ATG CAC GCG GCG GCG ATA TCG GCG 2064
612 D Q A L S L S R L S I H D S T S A M H A A A I S R 636
2065 AAA TCG CTC GAA GAG GTG CCC GTA CTT GCA AAA GTA CGT GTT TCA ACC CAA ACA GAC AAG CGC ATC GCT CAT CCC 2139

```

637 K S L E E V P V L A K V R V S T Q T D K R I A H P 661

2140 ACA GCC GTC AAC AAG ACT GTC GCC ACA CAA TCG ACG CGC GGC TCA AGC GAC CGG CAA GAC GAG CTT GAC AAA GCT 2214
662 T A V N K T V A T Q S T R G S S D R Q D E L D K A 686

2215 ACT TCG ACA GCT ACG TCC GTT GCT GTG CCA GTG AGC ATT CGC AGA AAA TCG CAG GAG GTG TCA GCG GAC GCG GCT 2289
687 T S T A T S V A V P V S I R R K S Q E V S A D A A 711

2290 CTG TCA ACC ACA CCA CGC GCT GAG GCC CTC AAC CGT CTT TCA ATG GAG TCA TCG CAC ACA TAT CCA CCT TCT CCA 2364
712 L S T T P R A E A L N R L S M E S S H T Y P P S P 736

2365 TCC ACC TCA GAT CCG CCG TCA TCT TTC GAT GAG GTG CAA AGG GAG GCC GAA CGA GGT TGG GCG ATC CCC GAC TGG 2439
737 S T S D P P S S F D E V Q R E A E R G W A I P D W 761

2440 CTC AAA TCC GCG CCC GCT AAG GTC CTG GGT CTT GCA ACG GAC AGC AGC TCA GCA GCC TCC ATG AAA TCG CAG CCT 2514
762 L K S A P A K V L G L A T D S S S A A S M K S Q P 786

2515 ACC AAT ACA GGA GCA AGA AGG CGA CGC AAA GTG CTG GAA AAG TGG ACA GAC GAA AGG GGT GAC GAT GTC AGC AGA 2589
787 T N T G A R R R R K V L E K W T D E R G D D V S R 811

2590 GCA GAG TCG AGC AAC ACA GAC AAT GAC GAT GAC GTC TTG TCT CAT TCC ATC CTC TCG ACG CAC TCC AAC TAC TCG 2664
812 A E S S N T D N D D D V L S H S I L S T H S N Y S 836

2665 ATG CTC GAC GCA GAT AAC GAA GCA GCC GAG ACG TCG GAT CAC ACG AGC GTC GCT GTT GAG TTC CGC GAC ACT TTC 2739
837 M L D A D N E A A F R S S S G I S V A V E R D T F 861

2740 GGG ATC GGA GAG GAC GAA GGG CTG ATC GGT CAC ACG CAT GCC TAT CTT TAT CGG GTC TTG CCT GTG GCT GGA AGG 2814
862 G I G E D E G L I G H T H A Y L Y R V L P V A G R 886

2815 TTC TTT GTT GCC GAA CAC CAC CTG GCA TTC CGC TCG TCT GGC ATC GCA GCC AAG ACT GTG GGT CGG ACA CTC ATG 2889
887 F F V A E H H L A F R S S S G I A A K T V G R T L M 911

2890 CTG GTC CCT CTG CAC GAT GTC ATC TCG GCT GCC AAG CAT GTT GCG TTC CGT CCT GGT CAT CAT GGT ATG GTG ATC 2964
912 L V P L H D V I S A A K H V A F R P G H H G M V I 936

2965 AAT ATC AGC GGC CAC GAA GAG CTC TTC ATC GAA ATT TCT TCG GCT CAC CGA CGC GAT GAA TTG CTC GGC CTG ATC 3039
937 N I S G H E E L F I E I S S A H R R D E L L G L I 961

3040 GAA TAC CAG CTT GAG CTT GTC CGA GGT GGG AGG GAA AGC AGG ATA TCG CAT GAG GCA GCC ACT CGC GAA CGG TCG 3114
962 E L D A E H L V R G R E S H E A A T R E R T I M 986

3115 AAT GCG CTC GTG CTT CGA GAC TTG AGC GAA CGG ATC CAT GAT GGA CCC GCG ACT GCA TCC ATG GCC TCG TCG GCG 3189
987 N A L V L R D L S E R I H D G P A T A S M A S S A 1011

3190 AAT TCG TCT GTG CTT TCT CAG ACA GGA CCA GGA TTT GAC AAT CAA TCG ACG AGC TTG TCG CAA CTT GAA GAA GGA 3264
1012 N S S Q T G P L S G F D N Q S T S L S Q L E E V 1036

3265 TCC AGT GTC CTG TCC TTT GCA CCA ACT GCT CCA CTC ACC TTT ACG ATG CTG ACC ATC GGC TCC AGA GGC GAC GTT 3339
1037 S S V L S F A P T A P L T F T M L T I G S R G D V 1061

3340 CAA CCC TAC ATT GCG CTT GCC AAG GGT CTC TTA GCT GAT GGA CAT CGG GTG AGA ATC GCA ACT CAC GCC GAG TTT 3414
1062 Q P Y I A L A K G L L A D G H R V R I A T H A E F 1086

3415 GGA CCT TGG ATC TTG GGT CAC GGC ATA GAG TTT AGC GAA ATC GGC GGC GAT CCG GCA GAA CTG ATG CGC ATC TGC 3489
1087 G P S L E H G I E F S E I G G D P A E L M R T I C 1111

3490 GTC GAA AAC GGC ACC TTC ACT GTA TCA TTT CTT CGC GAA GGC GTC ACC AGG TTC CGC GAC TGG CTC GAC GAT CTG 3564
1112 V E N G T F T V S F L R E G V T R F R D W L D D L 1136

3565 CTC GCT TCG GCC TGG CGT GCA TGT CAA GGT TCG GAC GTG ATC ATC GAA TGT CCA AGC GCC ATA GCG GGC ATC CAT 3639
1137 L A S A W R A C Q S D V I I E C P S A I A G I H 1161

3640 GTA GCT GAA GCG CTC CAG ATT CCC TAC TTT CGA GCG TTC ACC ATG CCC TGG ACA CGC ACT CGT GCC TAT CCA CAC 3714
1162 V A E A L Q I P Y F R A F T M P W T R T R A Y P H 1186

3715 GCG TTT GCC GTG CCG AGC AAG AAA GCA GGC GGC AAC TAC AAC TAT ATG TCG TAC GTC ATC TTT GAT CAG ATG TTT 3789
1187 A F A V P S K K A G G N Y N Y M S Y V I F D Q M F 1211

3790 TGG CGT GCC TCT GCT TTC CAG ATC AAT CGA TGG CGA AAG AAG CTG TTG GGT CTG AAG CCG ACC AGC TTT GAC AAG 3864
1212 W R A S A R I N R W R K K L L G L K P T S F D K 1236

3865 TTG GAA CAG CAC AAA GTA CCT TTT ATC TAC AAC TTC AGT CCC AGC CTT GTA CCT CGA CCG TTG GAT TGG TTC GAG 3939
1237 L E Q H K V P F I Y N F S P S L V P R P L D W F E 1261

3940 TGG ATC CAT GTG ACA GGA TTC TGG TTC TTG GAC AAT CCG GAC AAT TCA TCG AGC AAG AAA TGG GAG CCA CCA GTG 4014
1262 W I H V T G F W F L D N P D N S S S K K W E P P V 1286

4015 GAC TTG GTC GAA TTC ATC CGA GTG GCT AGG GAG AAC AAG AGG AAA TTG GTA TAT ATC GGG TGG GGG TCA ATC GTG 4089
1287 D L V E F I R V A R E N K R K L V Y I G W G S I V 1311

4090 GTG CCT GAT GCA GCG GCG ATG ACG CGA TGC GTT CTG CAA CGC GTG AAG AAG AGT GGA GTG TGT GCA ATC TTG TCC 4164
1312 V P D A A A M T R C V L Q A V K K S G V C A I L S 1336

4165 AAA GGT TGG TCG GAT CGA CTT TCT TCT GAT CCA TCG ACG CCG ATC GAT GCC AGT ATC AGC GCC GAT GTA TTT CAA 4239
1337 K G W S D R L S S S D P P I D A S I S A D V F Q 1361

4240 GTA TCG TCG GTC CCG CAC GAT TGG TTG TTC CCA CAG ATT GAT GCG GCA TGT CAT CAC GGG GGT GCG GGA ACG TTG 4314
1362 V S S V P H D W L F P Q I D A A C H H G G A G T L 1386

4315 GGG GCT AGT TTA AGA GCC GGA TTG CCG ACA GTG GTC AAG CCG TAT TTT GGT GAC CAA TTC TTT TGG GGT CAG CAG 4389
1387 G A S L R A G L P T V V K P Y F G D Q F F W G Q Q 1411

4390 ATC GAG AGT CTG GGT GTC GGC AGT TGT GTA AGG CAG CTG ACA GTG GAT AGT TTG GCA AAG GCG TTG GTG AGA GCG 4464
1412 I E S L G V G S C V R Q L T V D S L A K A L V R A 1436

4465 ACA AGC GAT AAG AAG CAG ATC GAC AGA GCG AGG AGG TTG GGC GAG CAG ATC AGG ACC GAA GAT GGT GTG GGT GAC 4539
1437 T S D K K Q I D R A R R L G E Q I R T E D G V G D 1461

4540 GCA GTA AAG GCG ATT TAC CGG GAC TTG GAG TAT GCG ACG AGT STA ATC AAA AGG GAT ACT CGG I E H M 4614
1462 A V K A I Y R D L E Y A T S L I K A R D T R I E H M 1486

4615 CCT ATG GTT ACA CGC ACC CGG ACC ACA GAT ACT GCT TTG GCG CGT AGA GGC AAA GAC ACC TCA GTA GCC GTG CAA 4689
1487 P M V T R T R T T D T A L A R R G K D T S V A V Q 1511

6.2 Nukleotidsequenz und Alignment der isolierten Klone pScosRed1 und pCM54Red1

[illegible]

• 600 • 620 •

636 GCGTGAATTGGTCGCTTTTCAAGTTTGAAACCCCTGGAAAGAAAATTTGCCTTGGTAAAAAAATCTCGTATTAGAAAAGCGCATTATTGCAGCGCTTG 735
640 • 660 • 680 • 700 • 720 •

736 TGGGTAAATTGACCCAACCTTACGCTCGAGTCGTCGCTCTCCCGCTCAGCAACATAACTCCGACGTGGTCGACCGAATTTGCACCGTACTCGACACTCTT 835
740 • 760 • 780 • 800 • 820 •

901 -----GCGCAAACG----- 909
|||||

836 CTGTCGAAGCAATCTGTTCAAACCCAAAAGCGTTGGGGTTGGGTTGGGGGAACAAGCGCAACAGTGGCCTTGGCTCGACAGCTGAACGAAGACCAAGT 935
840 • 860 • 880 • 900 • 920 •

936 GCCACAAAATCACAGATTTGACTTGGCCTTTTTTGGCGAACTCATTTTCGGCTCAGATGCTGACAAGACATGAAATGCTCAGAGCCATGCATCTATTGC 1035
940 • 960 • 980 • 1000 • 1020 •

1036 ATCTGTCGTTTCGATTCTGTGCCATCTGATCTGATCAGTTTGCATCTCGTCAATCATCTTGTGTCCTTGGTCGCTTCGTCGCATCACACTTGGCAC 1135
1040 • 1060 • 1080 • 1100 • 1120 •

1136 GGTGCCGGCTGGTGCATCCGACTGCATCAAGCTCGTCATCGCCAGTGATTCCAAGCAACAATCTCGAATCTGCTGCTGACCTGACCTCGCCTTAGC 1235
1140 • 1160 • 1180 • 1200 • 1220 •

910 -----CTTTACAATCG----- 920
| |||||

1236 ACCTCATCGCATCGGTCGCTTCATCCCAATCATTCGTCGCTTATCGGAGCGTCCAGCCAATCGAGCGTTGACTTTTCCTCCGTCCAAATGACCGGGT 1335
1240 • 1260 • 1280 • 1300 • 1320 •

1336 CTTTCTCTCTCAGCTGCTCGATCTCTTAGCAGCCACGCGTAATATCGAAGTACACGCGGGCTGCCTGCGTTGCGTTTGTCTTCTGCTTCTCGACCT 1435
1340 • 1360 • 1380 • 1400 • 1420 •

1436 GCATCTTCTGTACTGCCTTCACCTTTGCAGATCACTCACAACCTCTGGTTGCAGCCCTGCAGTCAGGTCTGCTCAACTTTCCGATCTCGTAGTCCGAG 1535
1440 • 1460 • 1480 • 1500 • 1520 • 940

921 -----TGAATCAGCAATCATGAATC 940
| | | | |

1536 CCGCTCTGCACTCGAAAAAGGTGGCGCTCTCTGTCTCTGgCCTTTATCTTTCTTGCAATTAACGTCTTCCGACTTTGCTAGTCCCTCGTACATGTGGC 1635
1540 • 1560 • 1580 • 1600 • 1620 •

941 GTGAATACAGCCATTCGTGATTCGTG----- 966
|||||xxxxxxxxxxxxxx

1636 CCATCTACAGCCTCTAGACAGAATCCAGAGCACTTCTGCTAGGCGACCGCCATTTCAGAACCCTGCTGGTTTACCTATGTTGCGCTCTCAGTAGAAGGTGC 1735
1640 • 1660 • 1680 • 1700 • 1720 •

1736 GCGCTTTCACCACGGAAGTTGAACCTCCGATTTTTTCGCCGCCACGCCCTCCAGGTGATCCCGGCTCCAGAGCAGCAGCGCTTGTATCCACTTGAAAA 1835
1740 • 1760 • 1780 • 1800 • 1820 •

1836 CTACCTCGTTCGACTGTTGGAGTCGTTTTTCAGAACCCGTAGCCACCACGCTCAGCCATCTCATTCCTCGCCTAGGCCTGCTCCTCATTTGTTACT 1935
1840 • 1860 • 1880 • 1900 • 1920 •

1936 CTATCCTCCTGACATCAACGCACCACACCGATACTCTGTGCACTCCAGTTGCGCTCATCGCCTGCATTCACTACCTACCTGATTCGATCGTGATACATTC 2035
1940 • 1960 • 1980 • 2000 • 2020 •

2036 CATGCAGGTGCTTGAGGCTTGACGCCGTGCCACACAAAGTGCTGTTCAATCCACACTGGCAACTGCAAAAAATCCATTTCATAATGTATCCCATAAAT 2135
2040 • 2060 • 2080 • 2100 • 2120 •

2136 TCGACAGTTGCTCCTTCTGCAGTGGCGGTAGCATACCGAGCAAGCGCATGGGCGACGATGCGAAATCCGACTCCAATCTCAGCAAGCGACGAAACGGA 2235
2140 • 2160 • 2180 • 2200 • 2220 • 1040

967 -----ATTGTGCGGATTCACTGTAGAAATATCTACGATTGGCGTTTAGTCTGATCGCGACAATCATGCAACCCCTTGCAAGTAAC 1046
|||||

2236 AGCGGCCGAGTCTTGTGACATTTGTCG===== 2264
2240 • 2260 • 1060 • 1080 •

1047 CTAACCGGTATACACGAGTGACCGGACGGGAACGAGTAGTGTGT----- 1091
| | | | |

2265 =====TCGCGCAAGATTAAGTGTGTGCTCTCAAGTAGACGCTCTGGACGCTTCTGAGACAACCGTTGTGTGAGTGC 2339
• 2280 • 2300 • 2320 •

2340 CGCGCGATCGATGCCAAATGCACGTTTACTATGTTCTCAGACGACCCGGTCCACAGACACATTTGCCAAGACGCCAGAAAGGAAGCAGCGGCCAGGA 2439
2340 • 2360 • 2380 • 2400 • 2420 •

2440 CTAAGGTATCAGCACCAGACTCGCATCTAGCGGCTACTCCCTTGTGCGACTCTCGATCTTTGACATCGGCGTTTGTGGAGGCGCTTGCACGCAAGTCGG 2539
2440 • 2460 • 2480 • 2500 • 2520 •

1092 -----CAGTAACGCT-ATA-CGCGCGCAGACGCACTCAA-TACACCAGCGGTA-C 1138
| | | | |

4640 TCCACTGGCTGTGCGCACGCCACGCATGCGCACCGCGCTCGAGGCGCGCTGCCAGCCTGACCATGATGGACATGGTGAATGTGTCCGGCCTTCGCCG 4739
 4640 • 4660 • 4680 • 4700 • 4720 •

4740 CCGCCGGGTCGGCGTCGTGCGACGCCGGTGTGCGCCCATGTGCACACTGCACGCCAATATCGTGACCACGGAATCACTCGTGCCTTCCTGCTGACCGA 4839
 4740 • 4760 • 4780 • 4800 • 4820 •

1251 -----CCACACGC----- 1258
 |||||
 4840 GTACCGCATATGGTCACCACACGCATCCGCGAGCTGAAACTTCGACAACCGCTCGCACTCGCGCTCGCCTCGTGCCTCCCGAAGATGTGCACAGCCAA 4939
 4840 • 4860 • 4880 • 4900 • 4920 •

1259 -----GCG-CGACACGCGCTCAATGCAC 1280
 |||||
 4940 GTATGGCAGGAAGCAGCCGCAATCTGCTGCGCAGCTTCAACAACCTCCCGCTCGACGCTCTGGCGAGCAACGGACAGAGTCTGATCGACAAGATTATCT 5039
 4940 • 4960 • 4980 • 5000 • 5020 • 5040 •

1281 CCGCAGT-ACGACCGCGT-ACGCGCGCAAGTA-T---AGTAACCTCGCCAGAGTTTCCCGCG-T-TC-A-CAACATAGCGTGGT-A-GCGAGAAGCCCA 1368
 |||||
 5040 ACGTGGTCACCGCCTTGTGAACCGCACAAAGCAGTCGCGGTGTGACGACTGGGTTTGGGTACATGTGAGTTTGTGGCGACGCTGACGCGGTGAGTCA 5139
 5040 • 5060 • 5080 • 5100 • 5120 •

1369 GA-GTAGATTACACAAAGT-CGCTGGACGAC-TGTGGGAACACGCGT---TGGCTACAGACTCGT-ACCAAGTGAAGAAC-CTGA-GGGAGAAC-AGA 1458
 |||||
 5140 GACGAGGAAGGAGATAGTTCGAGCGAGATCGAGGAGGAAGACGCGGTGACGGCGAGCGATGGGTAAGCCAGAGATGGGCGGTGAGGGGGTCTGGA 5239
 5140 • 5160 • 5180 • 5200 • 5220 •

1459 -CT-CATGCATCTGGCCAGTGTGTGGCCACAGCTAGTCAGTTGTATGAGGAGCTGACGTATAGGGAAGCTCATGTAGGATCTCCAGTCGACTCATGTA 1556
 |||||
 5240 GGTGCATCATCTGGCCAGTGTGTGGCCACAGCTAGTCAGTTGTATGAGGAGCTGACGTATAGGGAAGCTCATGTAGGATCTCCAGTCGACTCATGTA 5339
 5240 • 5260 • 5280 • 5300 • 5320 •

1557 CATAAATACAGAGGAACGCTCACACTTTGTAGTTAGTCCCTTGTCCAATTACACTACCCAAATACATCCCAACCATTCTCGACCTACTCAGTCCCA 1656
 |||||
 5340 CATAAATACAGAGGAACGCTCACACTTTGTAGTTAGTCCCTTGTCCAATTACACTATCCAAATACATCCCAACCATTCTCGACCTACTCAGTCCCA 5439
 5340 • 5360 • 5380 • 5400 • 5420 •

1657 ACTCGCCTCTCTAAGGAAAGGAGACTTCGATCATCCAGCGCCGCTAAGGATTACCGCGAATATTGAATAGGTTATGAGCCCAATCAATGATCAAGAC 1756
 |||||
 5440 ACTCGCCTCTCTAAGGAAAGGAGACTTCGATCATCCAGCGCCGCTAAGGATTACCGCGAATATTGAATAGGTTATGAGCCCAATCAATGATCAAGAC 5539
 5440 • 5460 • 5480 • 5500 • 5520 •

1757 CTTGCCTTCTCTCTATGAGGTTGGACTACCCAAACGGCTGATGTCCTCGGAGGACTACTTCGAATGGGCGACCTCGATGCAAAATGTCTTTCGTGCA 1856
 |||||
 5540 CTTGCCTTCTCTCTATGAGGTTGGACTACCCAAACGGCTGATGTCCTCGGAGGACTACTTCGAATGGGCGACCTCGATGCAAAATGTCTTTCGTGCA 5639
 5540 • 5560 • 5580 • 5600 • 5620 •

1857 AAAACGCGAACTTATGTTTCATCATCGAGGACGACTCGTCAAACCGAGGAACATCTGGGTGAGGAGACCTTAAGGAAGTGAAGCTCGGCAACAAATT 1956
 |||||
 5640 AAAACGCGAACTTATGTTTCATCATCGAGGACGACTCGTCAAACCGAGGAACATCTGGGTGAGGAGACCTTAAGGAAGTGAAGCTCGGCAACAAATT 5739
 5640 • 5660 • 5680 • 5700 • 5720 •

1957 CCCTACTAAGGATATCGCCGAGTACTATCGAGCTGACGTGGAAGCAGCAGCATACTCCTCAACTCCCTTGGACCCGCCCAACAGCCCTGGTCGATACG 2056
 |||||
 5740 CCCTACTAAGGATATCGCCGAGTACTATCGAGCTGACGTGGAAGCAGCAGCATACTCCTCAACTCCCTTGGACCCGCCCAACAGCCCTGGTCGATACG 5839
 5740 • 5760 • 5780 • 5800 • 5820 •

2057 TCAACTACTGCTCGAAAGTCTGGGAGAACTTCGCGAGAACTACGCGCAGAACGTTGCTCAGCAGATTGCTTCACTCGAAGCGCAGTTGGCGAACCTCT 2156
 |||||
 5840 TCAACTACTGCTCGAAAGTCTGGGAGAACTTCGCGAGAACTACGCGCAGAACGTTGCTCAGCAGATTGCTTCACTCGAAGCGCAGTTGGCGAACCTCT 5939
 5840 • 5860 • 5880 • 5900 • 5920 •

2157 ACCAAGGAGATGACAAGATCAACGCTTACTCTACAAGTTGGAGACTATCTGCAGGAACTTGACCACGTGGATGCTCCGGTTAGCGGACTTCGCAAACT 2256
 |||||
 5940 ACCAAGGAGATGACAAGATCAACGCTTACTCTACAAGTTGGAGACTATCTGCAGGAACTTGACCACGTGGATGCTCCGGTTAGCGGACTTCGCAAACT 6039
 5940 • 5960 • 5980 • 6000 • 6020 •

2257 GAGAACCTTTCTGCGTGGCCTCGGTCCCGACGAGTGTCTGGCGAAGACTTTCTACTTCAACACTCGTCTCTTCTTCCAGAAGGAAGGAGATTCCGAC 2356
 |||||
 6040 GAGAACCTTTCTGCGTGGCCTCGGTCCCGACGAGTGTCTGGCGAAGACTTTCTACTTCAACACTCGTCTCTTCTTCCAGAAGGAAGGAGATTCCGAC 6139
 6040 • 6060 • 6080 • 6100 • 6120 •

2357 GAAACAGCCAAACAAGAAGGCCCTGGAAGACTACGAAATGCGCTCAGCAGGATATGGCTGAAGAAGCCGAGCAAAAGTCTTTCCGGCGCCAAATACCCAG 2456
 |||||
 6140 GAAACAGCCAAACAAGAAGGCCCTGGAAGACTACGAAATGCGCTCAGCAGGATATGGCTGAAGAAGCCGAGCAAAAGTCTTTCCGGCGCCAAATACCCAG 6239
 6140 • 6160 • 6180 • 6200 • 6220 •

2457 CTGGGCCATGCAAGCCAGTCGACGCTGTCAAAAAGGGCAAAGACAAATCTGCATAACTGCAAGAGGGATAACCATTAACCTCGAAGACTGCTTCAT 2556
 |||||
 6240 CTGGGCCATGCAAGCCAGTCGACGCTGTCAAAAAGGGCAAAGACAAATCTGCATAACTGCAAGAGGGATAACCATTAACCTCGAAGACTGCTTCAT 6339
 6240 • 6260 • 6280 • 6300 • 6320 •

2557 GGAAGGAGGTCCCAAAACAAGGATCGCACCGAGAAGCAAGAGAAAGTACGGGAAACCTGGCACAAAGTCGACTCCGACGAGATG 2656
 |||||
 6340 GGAAGGAGGTCCCAAAACAAGGATCGCACCGAGAAGCAAGAGAAAGTACGGGAAACCTGGCACAAAGTCGACTCCGACGAGATG 6439
 6340 • 6360 • 6380 • 6400 • 6420 •

2657 AATCTGTGTCTCCACGTGTCACACCCGATGACAACGTGCTCCCAAAATGAAACCTGGATCATTGACTCTGGCGCAAGCCGACACATGACCGCGCACA 2756
 |||||
 6440 AATCTGTGTCTCCACGTGTCACACCCGATGACAACGTGCTCCCAAAATGAAACCTGGATCATTGACTCTGGCGCAAGCCGACACATGACCGCGCACA 6539
 6440 • 6460 • 6480 • 6500 • 6520 •

2757 AGACCTCTTCTCGACGTACGACCATCTCCTGTCCAGGAGTATTCGTCGTGACAACAGAGGAGTTCCGGTTGCTGGCATGGGCAACGTGAGACTGGT 2856
 |||||
 6540 AGACCTCTTCTCGACGTACGACCATCTCCTGTCCAGGAGTATTCGTCGTGACAACAGAGGAGTTCCGGTTGCTGGCATGGGCAACGTGAGACTGGT 6639
 6540 • 6560 • 6580 • 6600 • 6620 •

2857 GATGAGTAACCGAAGGATCGCGAAGTCGATTACACTTCAAGATGTCCTCCACGTTCCAGGACTTGGGAACAATCTCTTCTACACCAAGGTGCAA 2956
 |||||
 6640 GATGAGTAACCGAAGGATCGCGAAGTCGATTACACTTCAAGATGTCCTCCACGTTCCAGGACTTGGGAACAATCTCTTCTACACCAAGGTGCAA 6739
 6640 • 6660 • 6680 • 6700 • 6720 •

2960 • 2980 • 3000 • 3020 • 3040 •

2957 CGCCTCGTGGGAAGCATCAACTTACCAGAAAAACGGTCGAAATCTTCGACAAAAAGGTCGACTGGCCCTGAGGGGCAACCGCCGTGGAGATGTGAAC 3056
 6740 CGCCTCGTGGGAAGCATCAACTTACCAGAAAAACGGTCGAAATCTTCGACAAAAAGGTCGACTGGCCCTGAGGGGCAACCGCCGTGGAGATGTGAAC 6839
 6740 3060 3080 3100 3120 3140
 3057 ACCTGCTAGTGGGAAGCAATACCAACGCGATAGCCAACTCGTTACTAGCGAGAAAGCCTTGGACCAAGCCAACTCTGGCAACACGGCTAGGCCACCT 3156
 6840 ACCTGCTAGTGGGAAGCAATACCAACGCGATAGCCAACTCGTTACTAGCGAGAAAGCCTTGGACCAAGCCAACTCTGGCAACACGGCTAGGCCACCT 6939
 6840 3160 3180 3200 3220 3240
 3157 CCACATGCAGGCCACGCTCAAGACGAGCATCGCTTACCGACGGCATGAACCTAAAGGCTATGTGCGGGCCCTCTGTGCGGAACAACTGCGAAACCTGCATC 3256
 6940 CCACATGCAGGCCACGCTCAAGACGAGCATCGCTTACCGACGGCATGAACCTAAAGGCTATGTGCGGGCCCTCTGTGCGGAACAACTGCGAAACCTGCATC 7039
 6940 3260 3280 3300 3320 3340
 3257 AAGTCGAAGCATAGGCACGACCGATCAAGAGCCGTGGACCCAAGACAACCTGACCACTGAGCTAGTTTACATGGATCTTGGGGGCCCTCTGCCGGAAG 3356
 7040 AAGTCGAAGCATAGGCACGACCGATCAAGAGCCGTGGACCCAAGACAACCTGACCACTGAGCTAGTTTACATGGATCTTGGGGGCCCTCTGCCGGAAG 7139
 7040 3360 3380 3400 3420 3440
 3357 CCTTATCCAAAGAGAAATATTACCTACTCATGCTGGACGATTGCACGAGATATGCTTCGGGGCGGCACTGATCTATAAGTCATCGGCCTTCCAAGCATT 3456
 7140 GCTTATCCAAAGAGAAATATTACCTACTCATGCTGGACGATTGCACGAGATATGCTTCGGGGCGGCACTGATCTATAAGTCATCGGCCTTCCAAGCATT 7239
 7140 3460 3480 3500 3520 3540
 3457 CCGAACCATCGATCGATGGACCAACCGCAACTGGGAAAGCGTATCTGCCGAGTCCGAACGGACAATGGTGGTGAATCTTGGAGCAGAGAGTTCTCGAAC 3556
 7240 CCGAACCATCGATCGATGGACCAACCGCAACTGGGAAAGCGTATCTGCCGAGTCCGAACGGACAATGGTGGTGAATCTTGGAGCAGAGAGTTCTCGAAC 7339
 7240 3560 3580 3600 3620 3640
 3557 TACCTCAATCACCAGGTATAGGACGAGAGGTCACTCCAAGATTACACCAACCAATCCAACGGTCTCGTGGAGCGCACTAACAGATTGTCAAGGATTATA 3656
 7340 TACCTCAATCACCAGGTATAGGACGAGAGGTCACTCCAAGATTACACCAACCAATCCAACGGTCTCGTGGAGCGCACTAACAGATTGTCAAGGATTATA 7439
 7340 3660 3680 3700 3720 3740
 3657 TTCGTCATGCTAGAAGAAGCAAACTTGACTACCCAGTACTGGCCATTTCGCTTCAGTCACGGGCTGAAGCTTCGAAACATGTGGGCCACGACGCGGA 3756
 7440 TTCGTCATGCTAGAAGAAGCAAACTTGACTACCCAGTACTGGCCATTTCGCTTCAGTCACGGGCTGAAGCTTCGAAACATGTGGGCCACGACGCGGA 7539
 7440 3760 3780 3800 3820 3840
 3757 TTCCTCCAAGACACCTCATGAAGGAATGCATGGCAACGCCAGGATCTTCAAGGCCCTCCGGGTCTTTGGGTGTAAGCATGGGCACGCGTACCTGACGAA 3856
 7540 TTCCTCCAAGACACCTCATGAAGGAATGCATGGCAACGCCAGGATCTTCAAGGCCCTCCGGGTCTTTGGGTGTAAGCATGGGCACGCGTACCTGACGAA 7639
 7540 3860 3880 3900 3920 3940
 3857 CTCGCCAAATCCCTGGATCCCAAGTCTGTTGAATGCATACACCTGGGACATGTTAGCAATAACCAACCTGACATATACAGACTCATGGACGTAGAAACCG 3956
 7640 CTCGCCAAATCCCTGGATCCCAAGTCTGTTGAATGCATACACCTGGGACATGTTAGCAATAACCAACCTTACATATACAGACTCATGGACGTAGAAACCG 7739
 7640 3960 3980 4000 4020 4040
 3957 CCCAGATCTTCAGAAAGTCGACACCTCATCTTCCGGGAGAACGAGCGGATTCGGCGAAAACTCAAGGCCCTTCGAGGAACTTTTCAGATGATGAAACTGG 4056
 7740 GCCAGATCTTCAGAAAGTCGACACCTCATCTTCCGGGAGAACGAGCGGATTCGGCGAAAACTCAAGGCCCTTCGAGGAACTTTTCAGATGATGAAACTGG 7839
 7740 4060 4080 4100 4120 4140
 4057 AACCCACGGGAAACAACTTCCCGAGGCCAGGATTACCGGCCCGGTCCGCTCATCGCTGAACATCCCAAGGACTTCCCATCGTCCGAAGAAGCCAGTCAA 4156
 7840 AACCCACGGGAAACAACTTCCCGAGGCCAGGATTACCGGCCCGGTCCGCTCATCGCTGAACATCCCAAGGACTTCCCATCGTCCGAAGAAGCCAGTCAA 7939
 7840 4160 4180 4200 4220 4240
 4157 CCAGTGGGAGCCACCAACTACCTCATCTCGCCTCAATAGAGGAAGCGCAATTAGCAGATACTACCGAGAGCGGTGATTCACTGGAGAGTCCAAC 4256
 7940 CCAGTGGGAGCCACCAACTACCTCATCTCGCCTCAATAGAGGAAGCGCAATTAGCAGATACTACCGAGAGCGGTGATTCACTGGAGAGTCCAAC 8039
 7940 4260 4280 4300 4320 4340
 4257 AACTTGTTCCTCAGCAGAATCCACAGATGACGAATTCCATGAACCGATCAACCTTATTCCTCAAGAAGGCGACCTCAAGACATCCGAGGCCGGGACTC 4356
 8040 AACTTGTTCCTCAGCAGAATCCACAGATGACGAATTCCATGAACCGATCAACCTTATTCCTCAAGAAGGCGACCTCAAGACATCCGAGGCCGGGACTC 8139
 8040 4360 4380 4400 4420 4440
 4357 CCCATCGCGCATCAAGAAATAGATGACGAGTCCGATGACTCTCTCGCTCTTCCCGACTCTCTACCAAAACAGTGGGAGGAGATACAACAACAGTGGGA 4456
 8140 CCCATCGCGCATCAAGAAATAGATGACGAGTCCGATGACTCTCTCGCTCTTCCCGACTCTCTACCAAAACAGTGGGAGGAGATACAACAACAGTGGGA 8239
 8140 4460 4480 4500 4520 4540
 4457 GATACAAGAACAGTGGGAGACAAAAACACGCAACGAGACGAGGACGAGTACGTTACAACCTTAGGGCAAGGCCACAGACTTGGCGATTACG 4556
 8240 GATACAAGAACAGTGGGAGACAAAAACACGCAACGAGACGAGGACGAGTACGTTACAACCTTAGGGCAAGGCCACAGACTTGGCGATTACG 8339
 8240 4560 4580 4600 4620 4640
 4557 CCCGACAGTGAACAACAACTTTTCAAAGCCACCGGCCACCTGAAACAAGCTCGCATGCGCGCCGACTGGCCCTATGGGAAGGTGCCATCCAGGCAGA 4656
 8340 CCCGACAGTGAACAACAACTTTTCAAAGCCACCGGCCACCTGAAACAAGCTCGCATGCGCGCCGACTGGCCCTATGGGAAGGTGCCATCCAGGCAGA 8439
 8340 4660 4680 4700 4720 4740
 4657 ACTCAAAAGTCATGAATCCAAAGACTTGGACCCCTCGTAGACCACCCACAAAAAAGCCACCAATGTGGTCAGCTGCAAAATGGGTATTTCGCCATCAAG 4756
 8440 ACTCAAAAGTCATGAATCCAAAGACTTGGACCCCTCGTAGACCACCCACAAAAAAGCCACCAATGTGGTCAGCTGCAAAATGGGTATTTCGCCATCAAG 8539
 8440 4760 4780 4800 4820 4840
 4757 AAAAAGGCCGATGGATCTCTCGCAAAATACAAGGCACGACTCGTCGACGAGGCTTCACACAGCGATACGGATACGACTACGACGAAACCTTCTCTCCAG 4856
 8540 AAAAAGGCCGATGGATCTCTCGCAAAATACAAGGCACGACTCGTCGACGAGGCTTCACACAGCGATACGGATACGACTACGACGAAACCTTCTCTCCAG 8639
 8540 4860 4880 4900 4920 4940
 4857 TAGTAAAGGCCACACGTTACGCAATCTCATCGGCCTCGCGCGGCATTGACCTGGAAGATTGTTTATTGGGACGAGTCACTGCTTCTTAAACGGAGC 4956
 8640 TAGTAAAGGCCACACGTTACGCAATCTCATCGGCCTCGCGCGGCATTGACCTGGAAGATTGTTTATTGGGACGAGTCACTGCTTCTTAAACGGAGC 8739
 8640 4960 4980 5000 5020 5040
 4957 CCTATCGGCAGAGTATACATGACGATGCCTCCCGGTACGAAAGTACCCGGGAAGGTCTGCTTCTTGAACAAAGCCATCTACGGTCTCAAGCAAGCCGGC 5056
 8740 CCTATCGGCAGAGTATACATGACGATGCCTCCCGGTACGAAAGTACCCGGGAAGGTCTGCTTCTTGAACAAAGCCATCTACGGTCTCAAGCAAGCCGGC 8839
 8740 5060 5080 5100 5120 5140

```
5060      •      5080      •      5100      •      5120      •      5140      •
5057 CGCGAATGGTACCTCTTCGCTACGAAGGTACTCGAACAGCTCGGATTACAGAACTGCAAGAAGACCACTGCCTCTTTTCATTCCAAGAAGGCCGACGAC 5156
|||||
8840 CGCGAATGGTACCTCTTCGCTACGAAGGTACTCGAACAGCTCGGATTACAGAACTGCAAGAAGACCACTGCCTCTTTTCATTCCAAGAAGGCCGACGAC 8939
8840      •      8860      •      8880      •      8900      •      8920      •
5160      •      5180      •      5200      •      5220      •      5240      •
5157 AGATCTTACTTGCAATTATACGTGATGACCTCGTCGCTGCGTCACCAAAAGCATCGGAATCGCCTGGCTCCACACCGAAATCCAACCTCATTTTAAAT 5256
|||||
8940 AGATCTTACTTGCAATTATACGTGATGACCTCGTCGCTGCGTCACCAAAAGCATCGGAATCGCCTGGCTCCACACCGAAATCCAACCTCATTTTAAAT 9039
8940      •      8960      •      8980      •      9000      •      9020      •
5260      •      5280      •      5300      •      5320      •      5340      •
5257 CACAGATCAGGGCGATTATCTTCTGTGCTCAACGTCAGCGTGTGCGAAATCTACCAATTCCACTTCCCTAGGCCAACCTGGTTACATCCAAAAGATCCTC 5356
|||||
9040 CACAGATCAGGGCGATTATCTTCTGTGCTCAACGTCAGCGTGTGCGAAATCTACCAATTCCACTTCCCTAGGCCAACCTGGTTACATCCAAAAGATCCTC 9139
9040      •      9060      •      9080      •      9100      •      9120      •
5360      •      5380      •      5400      •      5420      •      5440      •
5357 GATCGTTTCCAGATGCTCGAAGCGAAACCCGCTTCACACCATTACCCGCCACTGGCATTGCTCATCCCGAAAACCCCGAGCACTGCTCCGTCGCGGACA 5456
|||||
9140 GATCGTTTCCAGATGCTCGAAGCGAAACCCGCTTCACACCATTACCCGCCACTGGCATTGCTCATCCCGAAAACCCCGAGCACTGCTCCGTCGCGGACA 9239
9140      •      9160      •      9180      •      9200      •      9220      •
5460      •      5480      •      5500      •      5520      •      5540      •
5457 AGGAACTCTTCCAACAGCTCGTAGGCTCTGTCAACTACCTGGCTTGCTACACTCGACCAGATGTGGCATAACGCGGTACAAGCTCTCAGCCGCTATTTAGC 5556
|||||
9240 AGGAACTCTTCCAACAGCTCGTAGGCTCTGTCAACTACCTGGCTTGCTACACTCGACCAGATGTGGCATAACGCGGTACAAGCTCTCAGCCGCTATTTAGC 9339
9240      •      9260      •      9280      •      9300      •      9320      •
5560      •      5580      •      5600      •      5620      •      5640      •
5557 TCAACCGACGATCCACGCACTCTCTGCTGAAAAACACCTTCTCCGTTACCTCAAGACTACGAGGACTATCGCCTCCGTTTCCCAAATAGCGAGTGGG 5656
|||||
9340 TCAACCGACGATCCACGCACTCTCTGCTGAAAAACACCTTCTCCGTTACCTCAAGACTACGAGGACTATCGCCTCCGTTTCCCAAATAGCGAGTGGG 9439
9340      •      9360      •      9380      •      9400      •      9420      •
5660      •      5680      •      5700      •      5720      •      5740      •
5657 AGGAATCTGACCTAGAGGTCTTCACGGACGCTGATTTTGCAAAACAGAAGGCGATTACTCTCCCAATCAAGAGTTAACCACCAAAAAACAAGATCGTCA 5756
|||||
9440 AGGAATCTGACCTAGAGGTCTTCACGGACGCTGATTTTGCAAAACAGAAGGCGATTACTCTCCCAATCAAGAGTTAACCACCAAAAAACAAGATCGTCA 9539
9440      •      9460      •      9480      •      9500      •      9520      •
5760      •      5780      •      5800      •      5820      •      5840      •
5757 TACCGGTCGACACAACAACACCCCTCGCAAAAGCGTCACAGGAATGATCTTCCTAATGAACGGTTCCCAATCAGCTGGCTATCCAAACAACAACCTAT 5856
|||||
9540 TACCGGTCGACACAACAACACCCCTCGCAAAAGCGTCACAGGAATGATCTTCCTAATGAACGGTTCCCAATCAGCTGGCTATCCAAACAACAACCTAT 9639
9540      •      9560      •      9580      •      9600      •      9620      •
5860      •      5880      •      5900      •      5920      •      5940      •
5857 CATCGCAACCTCAACACAATGGCTGAATATA-TCGCGGCCGCGAAGCGCGAAAGAAGCGTTGTGGATCAGAAGCCTGTTTCATTCCCTTCAACTTCG 5955
|||||
9640 CATCGCAACCTCAACACAATGGCTGAATATACTCGCGCCGCGAAGCGCGAAAGAAGCGTTGTGGATCC===== 9711
9640      •      9660      •      9680      •      9700      •
5960      •      5980      •      6000      •      6020      •      6040      •
5956 AGGAAAAGAAGCAATACCTCACTACATTGACAACCAGGCAGCGATCCAGCTATGCAAGAACCCTGCTTACAGGCTACAAGGCATCGACATCATC 6055
=====

6060      •      6080      •      6100      •      6120      •      6140      •
6056 TACCACAAGATACGCGAATTGGCCCGCTCGGTGTTATCAACATCGAATATACCGAGTCAGGGGAGCAACGAGCGGATCGCTCACAAGACGCTCAACC 6155
=====

6160      •      6180      •      6200      •      6220      •      6240      •
6156 GTCACGAGATCGAAAAGTTTGAAGGAGATTGGCTGAAAGACAGGTCCAAGAGAAATCCTCTCAATAAACTCCATGACGGAAACATCTGCCTTTCAC 6255
=====

6260      •      6280      •      6300      •      6320      •      6340      •
6256 AACCTTCAATTGCCCCGCTGCAACGCGTGCAGAAAAGTAGGCAGATCGATACAACAGAAAGCCTGTTGGCCGAGCTTTTCAGCTGATGGGTTTGGATCA 6355
=====

6360      •      6380      •      6400      •      6420      •      6440      •
6356 TCCAAGAAGTCCCATCAAGGTTCAAGGACTTGCAAAAGGACTGGAACCCAACTGACACAGTGGTATCCACAAAAGTCACCATGCACACTTCTCGATT 6455
=====

6460      •      6480      •      6500      •      6520      •      6540      •
6456 CTCCTCCACTGGAGGATAACGAGAACGAATACATGATGTATTAGGGAACAAAACCTCACGCGTCGTAAAAACGAGCTGTGAGAGTTCCCAACCACG 6555
=====

6560      •      6580      •      6600      •      6620      •      6640      •
6556 AGCATCATGTAGGTTTCGACGACACGGAGCAGTCAAGTAGTCAACGAAAGCTCACCGAACGAAGCTTCAACGAGGCGCCACCTAGAGGAAAGATTTCGC 6655
=====

6660      •      6680      •      6700      •      6720      •      6740      •
6656 TGGAAAGAGCCGACGCGACCTCAAATGCCAGACACTTACACTTCGATCCGTAAGAGGACACGGCGCACACCTTCCAACCTTGGACGGAAGTTTT 6755
=====

6760      •      6780      •      6800      •      6820      •      6840      •
6756 ACGCCGCACACATCAAGACAGAGAGCAACATGGCGCGATCCCCACCGAGTGGGAGCGTCAGTGTCTCTGCGATTTCATGATTTGGGCACCTCAAAACCATT 6855
=====

6860      •      6880      •      6900      •      6920      •      6940      •
6856 CGAGTGGGAGTGTAGAAATATCTACGATTGCGCTTTAGTCTGATCGCCACAATCATGCAACCCCTTGAGTAACCTAACCGGATATACGAGTGACCGGA 6955
=====

6960      •      6980      •      7000      •      7020      •      7040      •
6956 CGGGAACGAGTAGGTGCTCAGTACGCGGCTATACGCGGACACGCACTCAGTACACCAGCGGTACGTCTGCGGTACGCGTGCATACACTCTCAGTAC 7055
=====

7060      •      7080      •      7100      •      7120      •      7140      •
7056 GCGCGCTATACGCGCGCAGACGCACTCAGTACACGAGCGGTACGTCCGCGGTACGCGTGCATACACTCGCAGTACGCGCGCATACGCGCGCAGACG 7155
=====
```

```

7160      •      7180      •      7200      •      7220      •      7240      •
7156 CACTCAATGCACCGCAGTACGACCGGTTACGCGCGCAAGTATAGTAACTCGCCAGAGTTTCCCGCTTCACAACATAGCGCTGGTAGCGAGAAGCCCA 7255
=====
7260      •      7280      •      7300      •      7320      •      7340      •
7256 GAGTAGATTACACAAGTCGCTGGACGACTGTGGGAATATGCCGTTGGCTACAGACTCAGACTCGCACCACGTGGTGAAGCTGAAAGAGAACAGACTC 7355
=====
7360      •      7380      •      7400      •      7420      •      7440      •
7356 ACGCATCTGGCCAGTTGTGGCCACAGCAAACCATTCGACCCCTACTCAGTCCCCACTCGCCTCTCTAAGGAAAGGGAGACTTCGATCATCCAGCGCCCG 7455
=====
7460      •      7480      •      7500      •      7520      •      7540      •
7456 CTAAGGATTCACCGAGAATATTGAATATTACGATTAAATCAAGTCTCTACCTTCCTCGCCTAGCCCTGTCAACCGCAACCTTGACGCCAGTGTACACCT 7555
=====
7560      •      7580      •      7600      •      7620      •      7640      •
7556 CTCACGTCGATACTCTGAACACACTCGTGACCAGCGTTCTCGGTATCACCCGAGCGAGCCACCCCTGCATCTCTCGGTTGGGCTGCGCATTTATTGATA 7655
=====
7660      •      7680      •      7700      •      7720      •      7740      •
7656 TTTTGGTGAATCTTTAGCGGGCGCTAGATGATCGAAGTCTGCCTTTCCTGAGAGCGAGTTGGGACTGAGCGTGAGTAGTGGTCTAGAAATGGTTTAATCA 7755
=====
7760      •      7780      •      7800      •      7820      •      7840      •
7756 CGAATGAATTTGGTAGTGTGATTGGACGAGGACTAACTACAAGTGTGAGCGTTCCCTCTGTATTATGTACATGAGCTGACTGGAGTATCCTACAT 7855
=====
7860      •      7880      •      7900      •      7920      •      7940      •
7856 GAGCTTCTCCCTATACGTCGCCTGCTCACACAGCTGACTAGCCGTGGCCACAAGTGGTCAGATGCGTGAGTCGGTTCTCCCTAAGGTTCTACCACCTGGC 7955
=====
7960      •      7980      •      8000      •      8020      •      8040      •
7956 ACGAGTCTGTGACGGCATATTCCACAGTCGTCACGCGACTTGTGGAATCTACTCTGGCTTCTCGCTACCGCGCTATGTTGTGAAGTGGGAAACTCT 8055
=====
8060      •      8080      •      8100      •      8120      •      8140      •
8056 GCGAGTAATACTATGCGGGCGGTACGGCGGACGTACCGCTGGTGTATGTGGACCGGTGGGGCGTGCGTATAGCGCGGTGACACCTACTCGTATCCG 8155
=====
8160      •      8180      •      8200      •
8156 TCCGGTACACTCGTGATACCGGTTAGGTTACTGCAAGGCTTGCATGATTGTGGGCGATC 8215
=====

```

Abbildung 34: Nukleotidsequenz der komplementierenden Klone pScosRed1 und pCM54Red1. Die obere Sequenz ist die des pScosRed1-Klons. Die untere Sequenz ist die des pCM54Red1-Klons. Die Positionen der Nukleotide sind angegeben. Der offene Leserahmen des Retrotransposon geht von Position 1733 bis 6194 des Klons pCM54Red1 und codiert für 1487 Aminosäuren.

Danksagung

Mein innigster Dank gilt meinen Eltern, die immer bedingungslos hinter meinen Entscheidungen standen. Besonders möchte ich mich bei ihnen dafür bedanken, dass sie meinen Kater Fritz adoptiert haben. Liebe Mama, vielen Dank für Dein riesiges Interesse an meiner Arbeit und die immerwährenden Motivationsparolen während der Zeit des Zusammenschreibens. Lieber Papa, vielen Dank für Deine Großzügigkeit mit Deinem „Schlepptop“, Deine Unterstützung in so vieler Art und Weise und dass für Dich das „Seelenheil“ immer an erster Stelle steht.

Mein herzlicher Dank gilt Michael Bölker, in dessen Gruppe ich meine Arbeit anfertigen durfte. Ganz besonders möchte ich mich für seine Riesenunterstützung während des Zusammenschreibens bedanken. Ich habe sehr viel mehr von seiner Arbeitsweise mitbekommen, als wir beide je gedacht hätten.

Ich möchte auch Renate Renkawitz-Pohl, Reinhard Fischer und Alfred Batschauer für die freundliche Übernahme der Gutachten und allen anderen Mitgliedern der Promotionskommission für ihre Mühen danken.

Thorsten Selmer danke ich für die Maldi-TOF-Messungen und die Hilfe bei deren Auswertung. Der AG Maier danke ich für 1000 Plätze bei den Sequenzierungen. Mein herzlicher Dank gilt auch Oliver Ladendorf für die Gespräche und vielen Hinweise in Bezug auf Retrotransposons. Jörg Kämper danke ich besonders für die Hinweise in letzter Minute bezüglich der Retrotransposons in Usti.

Ein herzlicher Dank geht an Andrea, für die es immer eine Selbstverständlichkeit war, mich bei ihr aufzunehmen, wenn ich mal wieder einen Schlafplatz in Marburg brauchte. Janni danke ich für die schönen Dienstag-Abende mit Ally und Co. und Tina dafür, dass alles so bleibt wie es ist, egal wie lange man sich nicht sieht. Siegi Huber möchte ich ganz besonders danken, dass sie mir die schamlose Seite von Usti gezeigt hat: „Ustilago maydis is a maize fucker“. Bei Peter Brecht möchte ich mich für das Interesse an der Fertigstellung meiner Doktorarbeit und das Vertrauen, das er mir entgegenbringt, bedanken.

Helge, Annette, Helga und Jörgili möchte ich dafür danken, dass es auch mal Gespräche gab, die nichts mit dem Labor zu tun hatten. Angela danke ich für die 1000 Antworten auf 1001 Fragen und die Geduld, die sie beim Kühlschrankschliessen hatte. Leonora danke ich, dass sie immer an meiner Seite war und nicht müde wurde, mir Ungarisch beizubringen. Mein

herzlicher Dank geht an Theresa für die harmonische Zeit, die wir miteinander verbracht haben und dafür, dass wir einander einfach immer verstanden haben.

Danke an Marisa für die superschönen Überraschungen, die sie mir nach den Wochenenden mitgebracht hat und einfach für die schöne Zeit, die wir miteinander verlebt haben. Ute danke ich für ihren positiven Realismus.

Ich danke Frau Heide Barbara Böttner herzlich für ihre Sorge und Mütterlichkeit und die tausenden von Kuchen, die sie uns beschert hat. Deanny danke ich für die vielen Antworten auf Fragen zu Formalien und ich wünsche ihr weiterhin noch eine problemlose Schwangerschaft. Hanne danke ich für ihre klaren Standpunkte. Den jetzigen Mitarbeitern der AG Bölker Sandra, Michael, Björn und Andrea möchte ich sehr für die Herzlichkeit, mit der ich immer wieder in ihren Kreis aufgenommen wurde, danken.

Lebenslauf

Personalien	Katharina Josephs Geboren am 2. Januar 1972
Schulbildung	1978-1982 Don-Bosco Grundschule in Neuss 1982-1986 Marienberg Gymnasium in Neuss 1986-1992 Albert Einstein Gymnasium in Kaarst Abschluss: Abitur, Note 2,8
Studium	1992-1993 Grundstudium an der Fakultät für Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf 1993-1995 Grundstudium an der Fakultät für Biologie der Technischen Hochschule Darmstadt Abschluss: Vordiplom in Biologie, Note 3,0 1995-1997 Hauptstudium an der Fakultät für Biologie der Philipps Universität Marburg Hauptfach: Mikrobiologie; Nebenfächer: Genetik, Virologie, Biochemie 11/97-10/98 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Terrestrische Mikrobiologie in Marburg zum Thema „Charakterisierung Nitratreduzierender Mikroorganismen in Reisfeldboden“ Betreuer: Dr. M. Friedrich, Prof. Dr. R. Thauer Abschluss: Diplom in Biologie, Note 1,3
Promotion	2/1999-12/2002 Doktorarbeit an der Fakultät für Biologie der Philipps-Universität Marburg zum Thema „Untersuchungen zur Bildung von Cellobioselipiden (Ustilaginsäure) in <i>Ustilago maydis</i> “ Betreuer: Prof. Dr. Bölker
Berufliche Tätigkeit	
1/2003-5/2003	Klinikreferentin im Bereich Onkologie bei der Firma Bristol Myers Squibb GmbH
seit 7/2003	Klinikreferentin im Bereich Onkologie bei der Firma Chiron GmbH